

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**IDENTIFICATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION LIANT LE
PROMOTEUR DE L'APOLIPOPROTÉINE D EN ARRÊT DE CROISSANCE
CELLULAIRE**

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE**

**PAR
LOUIS-CHARLES Jr LEVROS**

OCTOBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements iront à mon directeur de maîtrise Éric Rassart qui m'a fait bénéficier de l'expérience acquise dans son laboratoire ainsi que de son encadrement qu'il m'a procuré. J'ai eu l'honneur de faire partie de son équipe de recherche en biologie moléculaire, où tout au long de mon cheminement, j'ai su développer l'autonomie et la persévérance, tout en profitant de ses connaissances scientifiques.

J'adresse également un remerciement au Dr Elsy Edouard pour ses nombreux conseils et nos conversations scientifiques et à Manuel Buscarlet pour sa supervision lors de mon stage.

Je tiens à remercier vivement Sonia Do Carmo pour m'avoir permis de travailler sur son projet de doctorat et pour l'encouragement continu qu'elle m'a su apporter.

Je pense à présent à deux personnes: Véronique Voisin et Séverine Landais, pour avoir été là pour moi tout au long de ma maîtrise mais surtout lors de mon séjour d'un mois à l'hôpital.

Je remercie aussi, toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire. Ils ont tous, à leurs manières, rendu agréable mon séjour dans ce laboratoire. Particulièrement, mes amis Patrick Charbonneau et Piotr Banský, qui sans eux la remise de ce mémoire n'aurait pas eu lieu dans les délais prévus.

Je n'oublie pas non plus mes chers parents, Louis-Charles et Annette Levros et mes frères, Louis-Patrick, Louis-Philippe et Louis-Richard. J'ai une dette incomparable envers eux et tout particulièrement à Mélanie Thomas, grâce à elle, j'ai pu poursuivre ce chemin difficile.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
LISTE DES SYMBOLES.....	XI
RÉSUMÉ.....	XII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTATS DES CONNAISSANCES.....	2
1.1 Historique.....	2
1.2 Structure de la protéine.....	2
1.3 Rôles de l'apoD.....	3
1.3.1 Le cholestérol.....	4
1.3.2 L'acide arachidonique.....	4
1.3.3 Les sous-produits de l'hème.....	5
1.3.4 Rôle multiple de l'apoD.....	5
1.4 Expression génique de l'apoD.....	6
1.4.1 Expression tissulaire.....	6
1.4.2 Expression cellulaire.....	6
1.4.3 Expression associée aux pathologies.....	7
1.4.4 Induction de l'apoD <i>in vitro</i>	9
1.5 Structure du promoteur et du gène.....	10
1.5.2 Caractérisation du SRE et de la boîte CArG.....	14
1.6 Les facteurs de transcription.....	14
1.6.1 Rôles des facteurs de transcription.....	15
1.6.2 Les facteurs de transcription nucléaires résidents.....	16
1.6.3 Les facteurs de transcription liant le SRE.....	16
1.7 Conclusion.....	20

CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	21
2.1 Culture cellulaire et induction de l'arrêt de croissance	21
2.2 Extraction des ARN totaux	21
2.3 Dosage des ARN	22
2.4 Hybridation de type « <i>Northern</i> »	22
2.4.1 Gel d'agarose au formaldéhyde	22
2.4.2 Marquage radioactif d'une sonde d'ADN.....	23
2.4.3 Hybridation et lavage des membranes	23
2.5 Extraction de protéines à partir de cellules en culture.....	24
2.5.1 Extrait cytoplasmiques (CYT)	24
2.5.2 Extrait nucléaire (NE)	24
2.5.3 Extraction de protéines nucléaires par la « méthode rapide ».....	25
2.5.4 Extraction de protéines brutes.....	25
2.5.5 Dosage des protéines.....	26
2.6 Retard sur gel	26
2.7 Marquage radioactif des oligos	27
2.8 Purification et identification des protéines nucléaires.....	28
2.8.1 Purification des protéines nucléaires sur billes de fer couplées à la streptavidine.....	28
2.8.2 Coloration au nitrate d'argent.....	28
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	29
3.1 Induction génique de l'apoD en arrêt de croissance.....	29
3.2. Analyse de la liaison des séquences SRE du promoteur de l'apoD	31
3.2. Analyse de la liaison des séquences SRE du promoteur de l'apoD	32
3.2.1 Liaison du SRE par des protéines extraites par la méthode rapide.....	32
3.2.2 Liaison du SRE par des protéines extraites par la méthode de Dignam	36
3.3 Purification des protéines liant le SRE sur retard sur gel.....	39
3.4 Purification des protéines nucléaires sur billes de fer couplées à la streptavidine	39
3.5 Analyse du séquençage des protéines nucléaires purifiées	44
3.5.1 Le PARP-1	44
3.5.2 Les protéines hnRNP A/B ou CBF-A	44

3.5.3 Le hnRNP U.....	46
3.5.4 Le Kif4.....	46
3.5.5 Le BUB3	46
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	47
4.1 Liaisons spécifiques au niveau du SRE1.....	47
4.2 Purification des protéines nucléaires avec la séquence biotinylée SRE1-EBS couplée aux billes de streptavidine.....	48
4.3 Le PARP-1	49
4.3.1 L'ADP-ribosylation	49
4.3.2 Implication du PARP-1 dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire	50
4.3.3 PARP-1 : modulateur transcriptionnel.....	51
4.4 Les hnRNPs.....	51
4.4.1 Rôles des hnRNPs.....	52
4.4.2 HnRNP A/B ou CBF-A	52
4.4.3 Le CBF-A et l'élément cis EBS.....	53
4.4.4 Le CBF-A et la boîte CArG	54
4.4.5 Le hnRNP U.....	54
4.5 Interaction de Kif4 et de PARP-1	55
4.6 Interaction de BUB3 et de PARP-1	56
4.7 Analyse des protéines non-spécifiques.....	57
CHAPITRE V	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES	59
BIBLIOGRAPHIE	61

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure du gène de l'apolipoprotéineD humaine	11
1.2 Retard sur gel des séquences SRE1 et 2 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extraits nucléaires provenant de cellules NIH/3T3	13
1.3 Classification fonctionnelle des facteurs de transcription ayant une action positive	16
3.1 Induction de l'expression génique de l'apoD après deux jours dans les cellules NIH/3T3 en arrêt de croissance	29
3.2 Induction de l'expression génique de l'apoD après trois jours dans les cellules NIH/3T3 en arrêt de croissance	30
3.3 Retard sur gel de la séquence SRE1 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extrait brut provenant de cellules NIH/3T3 en croissance et arrêt de croissance	33
3.4 Retard sur gel de la séquence SRE1 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extraits provenant de cellules NIH/3T3 obtenus par la méthode rapide	34
3.5 Retard sur gel de la séquence SRE1 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extraits provenant de cellules NIH/3T3 obtenus par la méthode de Dignam ..	36
3.6 Purification des protéines nucléaires sur billes de fer couplées à la streptavidine .	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I. Sites et orientation de l'élément cis : « Ets-Binding-Site» (EBS), retrouvées sur le promoteur du gène de l'apoD, dans la région -2128 à +66 et ayant pour séquence CCGGA/T ou CAGGA.	39
II Peptides séquencés par spectrométrie de masse (MS/MS) de bandes excisées du gel SDS-PAGE 12% (Figure 3.6).	41
III Liste des protéines identifiées en condition de croissance (NE+) et d'arrêt de croissance (NE-) et leurs séquences en a.a. des peptides tryptiques obtenus par MS/MS	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
a.a.	Acide aminé
AA	Acide arachidonique
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AIF	Facteur induisant l'apoptose
AMPC	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AP	Protéine activatrice
Apo	Apolipoprotéine
APP	Alternance de purines et de pyrimidines
APRE	Élément de réponse de phase aiguë
ARNhn	ARN hétérogène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BBP	Protéine liant la biline
BC	Complexe binaire
BSA	Albumine de sérum bovin
BUB3	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles 3</i>
C	Cytosine
CB	Complexe binaire
CBF-A	Facteur liant la boîte CArG
CETP	Protéine de transfert d'ester de cholestérol
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine et amplification par PCR
CK	Caséine kinase
CNS	Compétition non spécifique
CQ	Complexe quaternaire
CREB	Élément de réponse au AMPc
CS	Compétition spécifique
CT	Complexe tertiaire
CTP	Cytosine triphosphate
Ctrl	Contrôle
CYT	Extrait cytoplasmique
DAG	Diacylglycérol
DEX	Dexaméthasone
DHA	Acide docosahénoïque
DHT	Dihydroxytestostérone
DTT	Dithiothréitol
E47	Séquence reconnue par TAL-1

EBS	Site de liaison aux ETS
ECL	Lésion au cortex entorhinal
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique, sel disodique
EGTA	Acide éthylèneglycol tétraacétique
E3M2H	Acide E-3-méthyl-2-hexénoïque
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
ETS	<i>E-twenty-six</i>
Exp	Expérience
FSE	Élément spécifiques aux acides gras
G	Guanine
GAPDH	Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
GCDFP	Protéine des fluides kystiques mammaires
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GTP	Guanosine triphosphate
HCOV	Coronavirus OC43 humain
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HnRNP	Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène
HRE	Élément de réponse Ha-ras
IK	Ikaros
IL	Interleukine
INS	Insecticyanine
IRF	Facteur régulateur de l'interféron
Ka	Constante d'affinité
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
Kif4	<i>Kinesin superfamily protein 4</i>
KLF2	Gène du facteur homologue au Kruppel
LCAT	Lécithine : cholestérol acyl transférase
LDL	Lipoprotéine de basse densité
MAD	Mitotic arrest defective
MOPS	Acide 3-N-morpholino-propanesulfonique
MRE	Élément de réponse aux métaux
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NE	Extrait nucléaire
NF	Facteur nucléaire
NFKB	Facteur nucléaire kappa B
NP	Tampon de solubilisation des protéines: Nonidet P
NPC	Maladie de Niemann-Pick de type C
Oligo	Oligonucléotide
OPN	Gène de l'ostéopontine
³² P	Isotope 32 du phosphate
PDAPP	Précurseur de la protéine amyloïde sous contrôle du promoteur du facteur de croissance « platelet-derived β »
PADPr	Poly (ADP)-ribose
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase

Pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérase en chaîne, amplification d'un segment d'ADN
PMSF	phénylméthylsulfonyl
PRE	Élément de réponse à la progestérone
Pré-ARNm	ARNm précurseur
RBP	Protéine liant le rétinol
RT-PCR	transcription inverse associée à une PCR, amplification d'un segment d'ARN
SDR	Répresseur dépendant des stéroïdes
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SRE	Élément de réponse au sérum
SRF	Facteur de réponse au sérum
SSC	Tampon salin citrate de sodium
STD	Standard de poids moléculaire
T	Thymidine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBI	Lésion traumatique au cerveau
TβIE	Facteur de croissance transformant β
TRE	Élément de réponse à l'hormone thyroïdienne
TC	Complexe tertiaire
TCF	Facteur de complexe tertiaire
TRIS	Tampon Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TTP	Thymidine triphosphate
UNR	séquence non spécifique
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

LISTE DES SYMBOLES

Ci	Curie, unité de mesure d'activité d'une source radioactive
°C	Température en degrés Celsius
cpm	Compte par million
g	Force centrifuge
h	Heure
m	Milli, 10^{-3}
min	Minute
%	Pourcentage
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
U	Unités
uv	rayons ultraviolets
V	Volt, unité de mesure de différence de potentiel
α	Rayon alpha
γ	Rayon gamma
n	Nano, 10^{-12}
μ	Micro, 10^{-6}

RÉSUMÉ

Des études antérieures sur le promoteur du gène de l'apolipoprotéine D (apoD) ont montré qu'un élément cis, appelé élément de réponse au sérum (SRE) et contenant une boîte CArG, était spécifiquement impliqué dans la surexpression de l'apoD dans des cellules en arrêt de croissance. L'induction de la synthèse de l'apoD est aussi observable *in vivo* dans des tumeurs à faible taux de prolifération et serait associée à la régression tumorale. Cette régulation serait effectuée par des facteurs de transcription liant de façon spécifique ces éléments cis situés sur le promoteur. La présente étude a pour but de purifier et d'identifier ces protéines nucléaires ayant des propriétés de liaison spécifique, en condition normale et d'arrêt de croissance, et qui seraient liées à une activité transcriptionnelle. La purification des protéines nucléaires a été effectuée sur des billes de streptavidine couplées aux séquences promotrices biotinylées et correspondant à la région -514 à -475 du promoteur. Le séquençage par spectrométrie de masse des protéines éluées a permis d'identifier plusieurs protéines, dont deux membres de la famille des « *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* » ; le hnRNP-U et le hnRNP-A/B, aussi connu sous le nom de « *CArG-Box binding Factor A* » (CBF-A), le PARP-1 de la famille des « *Poly (ADP-ribose) polymerase* », le BUB3 (« *Budding uninhibited by benzimidazoles 3* ») qui est un composant du point de contrôle de l'axe mitotique ainsi que le Kif4, une protéine faisant partie de la famille des kinésines. Les protéines hnRNP U et PARP-1 seraient directement impliquées dans l'induction de l'apoD lorsqu'elles lient son promoteur uniquement lors de l'arrêt de croissance, comparativement aux CBF-A et BUB3 qui sont présents dans les deux conditions. Le Kif4 est une protéine associée aux microtubules et spécialisée dans le transport de complexes de protéines et d'ARNms et a été purifiée uniquement en croissance cellulaire. De plus, les membres de la famille des hnRNPs sont connus pour jouer des rôles spécifiques dans la stabilité, l'épissage et le transport des ARNs entre le noyau et le cytoplasme. Plusieurs études rapportent aussi leur rôle de modulateur transcriptionnel. En accord avec ces résultats, certains membres de la famille des hnRNPs ont récemment été identifiés comme une nouvelle classe de protéines liant le poly (ADP-ribose) (pADPr), produit naturel du PARP-1. Finalement, ces résultats mettent en perspective les rôles inhabituels de ces protéines dans la modulation de l'expression génique de l'apoD et ultérieurement nous renseigneront sur la fonction physiologique de cette protéine.

Mots-clés : Apolipoprotéine D (apoD), arrêt de croissance, « *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* » (hnRNP), « *Poly (ADP-ribose) polymerase 1* » (PARP-1), « *CArG-Box binding Factor A* » (CBF-A), « *Budding uninhibited by benzimidazoles 3* » (BUB3), « *Kinesin superfamily protein 4* » (Kif4), spectrométrie de masse.

INTRODUCTION

L'apolipoprotéine D (apoD) est une glycoprotéine d'environ 30 KDa ne montrant aucune similarité structurelle avec la plupart des autres apolipoprotéines, mais qui ferait plutôt partie de la famille des lipocalines. Elle est retrouvée associée avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) du plasma humain mais le rôle précis qu'elle aurait à jouer dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie cellulaire du cholestérol n'est pas complètement élucidé. Telle une lipocaline, elle a la capacité de lier et de transporter une grande variété de petites molécules hydrophobes. Malgré ses nombreux rôles et ligands proposés, sa fonction physiologique reste encore inconnue. De hauts taux d'expression de l'apoD sont observés dans les tissus fibroblastiques de la majorité des organes examinés, chez plusieurs mammifères, ainsi que dans les sites de régénération et de remyélinisation des nerfs périphériques. L'apoD est aussi surexprimée dans plusieurs situations de neuropathologies. Elle est également induite dans plusieurs cancers, comme celui de la prostate et du sein. Cette surexpression de l'apoD serait en étroite relation avec les mécanismes impliqués dans l'arrêt de croissance et de différenciation cellulaire, tant *in vivo* qu'*in vitro*. Finalement, cette modulation à la hausse dans plusieurs situations pathologiques suggère que l'apoD soit une protéine de stress régulée par des facteurs de transcription liant des sites spécifiques sur son promoteur, communément appelés facteurs ou éléments cis. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du gène de l'apoD en arrêt de croissance, le but de cette étude a été de purifier et d'identifier ces protéines nucléaires par spectrométrie de masse dans cette situation de stress cellulaire induite par la déprivation de sérum. Les protéines identifiées sont le hnRNP U, le CBF-A, le PARP-1, le BUB3 et le Kif4.

CHAPITRE I

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 Historique

En 1963, l'apoD a été identifiée comme l'un des composants des lipoprotéines de haute densité du plasma, d'où son appellation apolipoprotéine, et à un moindre degré dans les lipoprotéines de basse et de très basse densité (LDL, VLDL; Ayrault-Jarrier *et al.*, 1963; McConathy et Alaupovic, 1973). Après avoir été clonée et subséquemment séquencée par Drayna et ses collègues dans les années 80, l'analyse de sa séquence en acide aminé (a.a.) a révélé son faible degré d'homologie avec les autres apolipoprotéines. Elle a été ensuite classée dans la famille des lipocalines ou α -2microglobulines (Drayna *et al.*, 1987) puis identifiée comme étant identique à la protéine GCDFP-24 (pour « *Gross Cystic Disease Fluid Protein* »). Cette protéine est capable de lier la progestérone et la prégnénolone, et se retrouve à très hautes concentrations dans le fluide kystique mammaire (Pearlman *et al.*, 1973; Dilley *et al.*, 1990; Balbin *et al.*, 1990).

1.2 Structure de la protéine

L'apoD est une glycoprotéine plasmatique constituée d'une seule chaîne polypeptidique avec une masse moléculaire apparente variant entre 19 et 32 KDa sur SDS-PAGE. Cette variation de masse est due, notamment, au taux de glycosylation sur les résidus d'asparagine, en position 45 et 178 (Schindler *et al.*, 1995) et peut contribuer à 18% de la masse totale de cette protéine (Rassart *et al.*, 2000). Sa séquence primaire contient 169 a.a. et est obtenue après clivage d'un peptide signal de 20 a.a. hydrophobiques. Elle contient 5

cystéines dont celles en position 41 et 165 de même qu'en position 8 et 114 forment des ponts disulfures, contribuant en partie à sa structure tridimensionnelle. La cystéine 116, quant à elle, pourrait former des liaisons disulfures avec d'autres protéines plasmatiques, comme certains membres de la famille des apolipoprotéines (apoA-I ou CETP : « *Cholesteryl Ester Transfer Protein* ») et la Lécithine Cholestérol Acyl-Transférase (LCAT), amenant à la formation de complexes (Peitsch et Bogusky, 1990; Spreyer *et al.*, 1990; López-Boado *et al.*, 1994; Rassart *et al.*, 2000).

Malgré le faible pourcentage d'homologie de séquence en a.a. distingué parmi les membres des lipocalines, la structure tridimensionnelle de l'apoD justifie, en toute logique, le choix de ce classement. Ainsi, sa structure est caractérisée par la forme d'un baril composé de huit brins bêta anti-parallèles et contenant une pochette de liaison hydrophobe (Drayna *et al.*, 1986; Salier, 1999; Glöckner et Ohm, 2003). Contrairement aux autres apolipoprotéines, l'apoD présente peu de structure en hélice α amphipatiques (Vogt et Skerra, 2004). Son classement serait aussi fondé sur leur rôle semblable de protéines transporteuses. Parmi les membres de cette superfamille, on retrouve la protéine liant le rétinol (RBP) avec 25% d'homologie, la protéine liant la biline (BBP) de *Pieris brassicae* avec 30-40% d'homologie et l'insecticyanine (INS) de *Manduca sexta* (Drayna *et al.*, 1987; Kathleen *et al.*, 1990; Provost *et al.*, 1990; Rassart *et al.*, 2000).

1.3 Rôles de l'apoD

Le rôle de l'apoD est généralement décrit dans la littérature comme étant un transporteur de petites molécules hydrophobes. Plusieurs ligands ont été proposés, dont le cholestérol, certaines hormones stéroïdiennes comme la progestérone et la prégnénolone, la bilirubine, l'acide arachidonique (AA), pour lequel elle a le plus d'affinité (Morais-Cabral *et al.*, 1995), et l'acide E-3-méthyl-2-héxénoïque (E3M2H), une phéromone présente dans les sécrétions axillaires humaines (Zeng *et al.*, 1996).

1.3.1 Le cholestérol

L'apoD pourrait être impliquée dans le transport d'esters de cholestérol dans le plasma en association avec l'enzyme LCAT et la CETP (Drayna *et al.*, 1986, 1987; Steyrer et Kostner, 1988 ; Glöckner et Ohm, 2003). La formation du complexe apoD-LCAT a aussi été démontrée pour avoir un effet stabilisateur sur la LCAT sans modifier significativement l'activité d'estérification du cholestérol (Steyrer et Kostner, 1988 ; Glöckner et Ohm, 2003). Ainsi, elle pourrait participer à un complexe de redistribution du ratio cholestérol/ester de cholestérol à partir des tissus périphériques vers le foie (Drayna *et al.*, 1986; 1987). Sachant que le cholestérol est relâché lors de la dégénération des nerfs, il est probable aussi, que l'apoD puisse récupérer cette molécule pour sa réutilisation en la disposant aux sites de régénération (Dilley *et al.*, 1990; Rassart *et al.*, 2000). Cependant, l'apoD aurait une faible affinité pour cette molécule dont la structure ne serait pas compatible avec sa pochette de liaison hydrophobe, comme cela a été démontré par des analyses de modélisation moléculaire (Lea, 1988 ; Peitsch et Boguski, 1990). D'autres études présument que la présence de l'apoD dans les cellules périvasculaires du cerveau et son rôle de transporteur de petites molécules hydrophobes impliquent un transport de ces molécules à travers la barrière hémato-encéphalique (Hu *et al.*, 2001).

1.3.2 L'acide arachidonique

Morais-Cabral et ses collègues (1995) ont montré par spectroscopie de fluorescence que l'AA est un ligand potentiel de l'apoD avec une K_a de $1,6 \times 10^8$ mole/litre. Une liaison 20 fois supérieure à celle de la progestérone. Par contre, l'apoD n'a pas d'affinité pour les métabolites de l'AA qui est probablement due à leurs caractères hydrophiles. Plusieurs études ont montré une déficience d'AA dans le plasma et le cerveau de patients schizophréniques impliquant un déséquilibre dans le métabolisme de phospholipides et d'acides gras, sachant que l'AA est l'acide gras le plus important dans le cerveau. Effectivement, l'AA et l'acide docosahénoïque (DHA) représentent plus de 90% des acides gras polyinsaturés dans le SNC (O'Brien et Sampson, 1965). La forme estérifiée retrouvée dans la double couche lipidique des membranes cellulaires peut être relâchée par des phospholipases

survenant à un signal extracellulaire. Suite à ce relargage dans le cytoplasme, l'AA agit comme second messenger impliqué dans plusieurs voies de signalisation et aussi, il peut servir comme précurseur pour la synthèse des prostaglandines et des eicosanoides (Morais-Cabral *et al.*, 1995; Von Euler, 1998). Ainsi, le métabolisme de l'AA est directement relié à la formation d'AMP cyclique (Lagarde, 1988). Sachant que la LCAT est impliquée dans la conversion de l'AA (forme active) en ester de cholestérol (forme inactive), l'apoD pourrait récupérer l'AA prévenant ainsi sa conversion. Cela laisse envisager un rôle important de la liaison de l'apoD avec l'AA dans la régulation cellulaire (Morais-Cabral *et al.*, 1995).

1.3.3 Les sous-produits de l'hème

Dans le cas des sous-produits de l'hème, comme les bilines : la biliverdine et la bilirubine ainsi que les porphyrines, l'apoD pourrait être exprimée localement et viendrait nettoyer ces métabolites toxiques et les acheminer dans la rate où la destruction des érythrocytes a lieu et où l'expression de la protéine est particulièrement élevée (Cofer et Ross, 1996).

1.3.4 Rôle multiple de l'apoD

Aucun des ligands physiologiques de l'apoD n'est connu. Quoiqu'il en soit, les nombreux rôles proposés sont souvent en rapport avec la fonction des ligands qu'elle peut lier *in vitro*, ce qui fait d'elle une protéine transporteuse multi-fonctionnelle dont la capacité de lier plusieurs ligands différents est spécifiquement corrélée à son expression tissulaire. Ainsi, l'apoD serait impliquée dans le métabolisme lipidique qui est essentiel aux fonctions des organes. Les organes exprimant l'apoD sont les glandes surrénales, les poumons, le cerveau, les testicules et la rate entre autres, et ont respectivement un rôle à jouer dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, dans la biosynthèse des surfactants, dans la myélination des neurones, dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes et la croissance des spermatozoïdes, et dans la destruction des érythrocytes sénescents (Provost *et al.*, 1990). Toutefois, depuis sa découverte qui date de plus de 40 ans et malgré l'identification de nombreux ligands potentiels ainsi que leur grande diversité biochimique, la fonction

physiologique de l'apoD demeure encore inconnue. Par contre, il a été suggéré que l'apoD soit une protéine ayant plusieurs fonctions spécifiques selon la molécule transportée, les tissus ou l'organe qui l'expriment (Rassart *et al.*, 2000).

1.4 Expression génique de l'apoD

1.4.1 Expression tissulaire

L'expression de l'ARN messenger (ARNm) de l'apoD est détectable chez presque tous les mammifères étudiés jusqu'à présent, entre autres : le lapin, le rat, la souris, le singe, le porc mais aussi certaines espèces d'oiseaux, comme le poulet (Rassart *et al.*, 2000). On la retrouve exprimée dans plusieurs tissus chez l'humain, comme les ovaires, le pancréas, les testicules, le cerveau, le fluide cérébro-spinal et les nerfs périphériques, et encore plus hautement exprimée dans les glandes surrénales, les poumons, le placenta, les reins et la rate (Drayna *et al.*, 1986; Provost *et al.*, 1990; Rassart *et al.*, 2000; Glöckner et Ohm, 2003). L'apoD est aussi exprimée dans les sécrétions lacrymales (Holzfeind *et al.*, 1995) et dans le corps ciliaire de l'œil où elle serait sécrétée dans l'humeur aqueuse (Escribano *et al.*, 1995), ainsi que dans les sécrétions axillaires apocrines (Zeng *et al.*, 1996) et dans l'urine (Rassart *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2004). Chez le singe, le lapin et le porc, la distribution tissulaire de l'ARNm de l'apoD est comparable à l'humain. Par contre chez le rat et la souris, l'expression est élevée et limitée au SNC, notamment la moelle épinière, le cervelet et le cerveau (Séguin *et al.*, 1995; Cofer et Ross, 1996). Quant au foie et aux intestins, qui sont des sites importants pour les autres apolipoprotéines, l'apoD est peu exprimée (Drayna *et al.*, 1986).

1.4.2 Expression cellulaire

L'hybridation *in situ* montre que l'apoD est surtout exprimée par les cellules fibroblastes à proximité des vaisseaux sanguins. Dans le SNC, elle est détectée dans les cellules gliales de la matière blanche, c'est-à-dire les oligodendrocytes et les astrocytes, et participerait probablement dans les processus de réinnervation neuronale (Navarro *et al.*, 2004). Dans le système nerveux périphérique (SNP), l'apoD est synthétisée par les fibroblastes endoneuronaux (Rassart *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001). Un rôle potentiel dans

l'homéostasie cellulaire est attribué à l'apoD par des études montrant que l'apoD est induite dans les cultures primaires de fibroblastes humains et murins en arrêt de croissance (Provost *et al.*, 1991; Do Carmo *et al.*, 2002).

1.4.3 Expression associée aux pathologies

1.4.3.1 Les maladies neurodégénératives

L'expression de l'apoD est grandement augmentée dans plusieurs situations pathologiques dans le SNC comme dans le fluide cérébro-spinal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose en plaque, de la schizophrénie, de la méningo-encéphalite, de la démence, de la maladie des neurones moteurs, de la maladie des prions et de la maladie de Niemann-Pick (une maladie génétique autosomale récessive induisant une anomalie du transport du cholestérol non-estérifié dans les lysosomes ; Patel et Pentchev, 1989; Pentchev *et al.*, 1994; Dandoy-Dron *et al.*, 1998; Terrisse *et al.*, 1998; Suresh *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2001; Reindl *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré l'implication de l'apoD dans les processus de réparation neuronale. Notamment, lors de la régénération des cellules nerveuses dans le SNP suite à une lésion des nerfs sciatiques, les productions d'ARNm et de la protéine d'apoD sont respectivement 40 et 500 fois plus importantes (Boyles *et al.*, 1990). D'autres expériences, utilisant les modèles de lésions neuronales excitotoxiques, induite par l'acide kainique dans l'hippocampe de rats, révèlent que les neurones pyramidaux destinés à la mort cellulaire surexpriment l'apoD (Ong *et al.*, 1997;1999). L'apoD est également induite dans d'autres modèles de neuropathologie incluant: les lésions traumatiques au cerveau (TBI pour « *Traumatic brain injury* »; Franz *et al.*, 1999) causées par percussions contrôlées du cortex, les lésions du cortex entorhinal (ECL pour « *entorhinal cortex lesion* »; Terrisse *et al.*, 1999) suite à des chocs électriques, les modèles murins de maladie neurodégénérative comme les souris NPC mimant la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC; Suresh *et al.*, 1998), les souris transgéniques PDAPP (pour précurseur de la protéine amyloïde sous contrôle du promoteur du facteur de croissance « *platelet-derived β* ») causant une pathologie apparentée à l'Alzheimer (Masliah *et al.*, 1996; Johnson-Wood *et al.*, 1997) et le coronavirus humain OC43 (HcoV) injecté intracorticalement

chez les souris C57BL/6 et causant une neuropathologie sévère associée à une réponse inflammatoire (Buscarlet, 2003). L'augmentation des taux d'apoD dans ces neuropathologies et dans les lésions cérébrales expérimentales chez le rat et la souris suggèrent que l'apoD serait une protéine de stress pouvant être considérée comme marqueur de pathologies d'ordre neurologique (Hu *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2004) et aussi de certains types de cancers (Diez-Itza *et al.*, 1994; Aspinall *et al.*, 1995) discutés dans la section suivante.

1.4.3.2 Les cancers

Tel que signalé précédemment, on détecte aussi des niveaux élevés d'apoD dans la plupart des cancers. En effet, dans le fluide kystique mammaire de femme atteintes d'une forme bénigne de tumeur de sein, la concentration d'apoD est 1000 fois plus élevée que dans le plasma (Balbin *et al.*, 1990). En rapport avec ce fait, une hypothèse a été émise stipulant que l'apoD serait impliquée dans la liaison et le transport d'hormones stéroïdiennes dans les tissus mammaires humains et dans la formation de kystes (Balbin *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 1992). De plus, la concentration d'apoD est particulièrement plus élevée dans les carcinomes différenciés que ceux modérément ou faiblement différenciés (López-Boado *et al.*, 1994; 1996). L'induction de cette protéine est aussi observable dans des tumeurs à faibles taux de prolifération où elle serait associée à la régression tumorale (Provost *et al.*, 1991). L'existence d'une relation entre l'expression élevée de l'apoD et la progression vers un phénotype plus différencié, donc moins invasifs, tant *in vivo* qu'*in vitro*, a été citée plusieurs fois par les chercheurs dans le domaine. Il a pu être démontré qu'une expression plus grande de l'apoD dans les kystes mammaires est associée à une baisse de progression en carcinome (Sánchez *et al.*, 1992), de même que dans les astrocytomes pilocytiques à faible taux de prolifération et qui sont une forme de carcinome non agressive et potentiellement curable. Les formes malignes et invasives, comme les astrocytomes fibrillaires, sont fatales et négatives par immunomarquage pour l'apoD (Hunter et Moreno, 2002). Il existe d'autres tumeurs cérébrales primaires, bénignes et potentiellement curables comme les gangliomes, les astrocytomes de cellules géantes subependymales, les xantoastrocytomes pléomorphiques et où l'apoD pourrait être associée à la formation de kystes et être considérée comme

marqueur important de diagnostique dans la différenciation tumorale. Sachant que le traitement thérapeutique pour les astrocytomes pilocytiques et fibrillaires est bien distinct, le pronostique doit être précis (Hunter *et al.*, 2002). L'apoD se retrouve en concentration élevée également dans le cancer de la prostate (Aspinall *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998).

1.4.4 Induction de l'apoD *in vitro*

En culture cellulaire, après l'ajout de certaines substances comme l'interleukine (IL)-1 α , la 1,25-dihydroxyvitamine D3, l'acide rétinoïque, de certains androgènes (le DHT et le DEX) ou de glucocorticoïdes dans les cellules cancéreuses primaires comme les ZR-75-1 (cellules épithéliales mammaires; López-Boado *et al.*, 1996) et les LNCaP (cellules cancéreuses de la prostate; Simard *et al.*, 1990; 1991; 1992), l'apoD est induite, alors que la prolifération cellulaire s'en trouve réduite. Cette corrélation observée *in vitro* implique une voie de signalisation probablement commune à celle empruntée lors de la différenciation tumorale mentionnée précédemment. Toutefois, l'effet contraire est observé après l'ajout d'œstrogènes et d'IL-6. Dans le cas de l'IL-6, l'induction de l'apoD et la prolifération cellulaire sont parallèlement inhibées, contrairement aux autres substances où elles sont inversement corrélées (López-Boado *et al.*, 1996; Rassart *et al.*, 2000). De la même façon, dans les cultures primaires d'astrocytes, l'apoD est régulée à la hausse par la progestérone et les oxystérols, comme le 25-hydroxycholestérol, et est sécrétée de façon constitutive plutôt qu'accumulée intracellulairement (Patel *et al.*, 1995). Ceci suggère un rôle potentiel de cette protéine transporteuse de molécules hydrophobes dans l'homéostasie du cholestérol durant la réinnervation et la régénération (Patel *et al.*, 1995; del Valle *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2004). De plus, lorsque des cellules fibroblastiques humaines et murines sont mises en arrêt de croissance que ce soit par confluence ou suite à une déprivation de sérum, le même effet sur l'expression du gène de l'apoD est remarqué (Provost *et al.*, 1991; Do Carmo *et al.*, 2002).

Eu égard à ces constats expérimentaux impliquant la prolifération cellulaire, il apparaît important d'étudier plus en profondeur les facteurs régissant cette régulation au niveau de l'expression du gène de l'apoD, plus précisément dans les cellules en culture en stade G_0 ¹. Cette étude permettra de comprendre le *modus operandi* de l'apoD dans l'arrêt du cycle cellulaire, incluant aussi la régression tumorale.

1.5 Structure du promoteur et du gène

Le gène de l'apoD a été localisé sur le chromosome 3 dans la région p14.2 chez l'humain (Drayna *et al.*, 1987) et le chromosome 16 chez la souris (Warden *et al.*, 1992). Ce gène est divisé en cinq exons dont le premier, non-codant et faisant 66 pb, est situé à 4,7 kb en amont du deuxième exon (Rassart *et al.*, 2000 ; voir Figure 1.1). De plus, l'analyse des gènes des lipocalines montre que leur localisation chromosomique ainsi que leur organisation exon/intron, en particulier chez les mammifères, est typique de la famille des lipocalines (Salier, 1999). L'ADNc de ce gène de 20 kpb a une longueur de 815 pb et son promoteur, ainsi que l'exon 1, comportent une série d'éléments de régulation potentiels appelés éléments cis. Étalisés sur plus de 2 kpb, ce promoteur dévoile la complexité de la modulation du gène de l'apoD.

1.5.1 Les éléments cis du promoteur de l'apoD

Plusieurs éléments cis se retrouvent au niveau du promoteur de l'apoD tels que les éléments de réponses à l'œstrogène (ERE), à la progestérone (PRE), au glucocorticoïde (GRE), à l'hormone thyroïdienne (TRE), de phase aiguë (APRE), au sérum (SRE; voir Figure 1.1).

¹ Le cycle cellulaire se divise en quatre phases distinctes : M; G_1 ; S et G_2 . Dans la phase G_1 (pour « Gap ») correspondant à la majeure partie du cycle cellulaire, il arrive que les cellules entrent en phase de quiescence nommé G_0 . Ce stade survient, notamment, lors de la différenciation cellulaire, comme dans les neurones et les cellules musculaires qui ne se divisent plus (Voet et Voet, 1998).

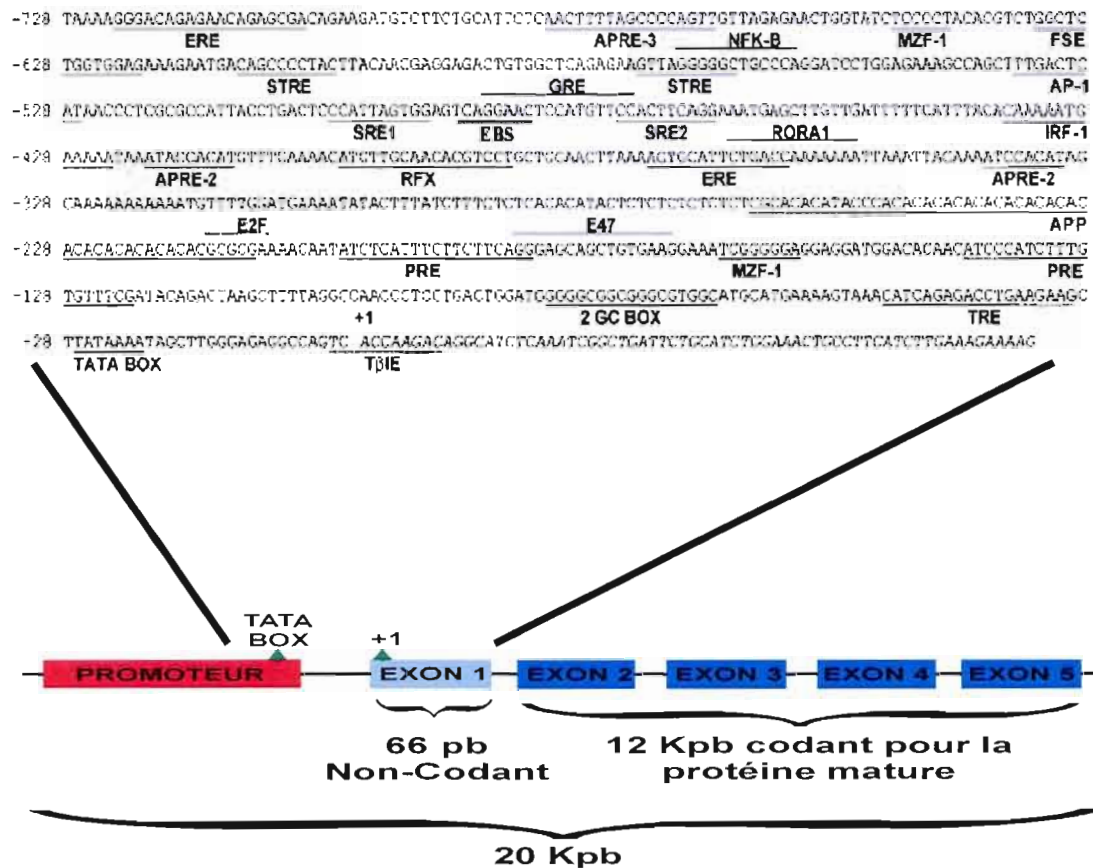


Figure 1.1. Structure du gène de l'apolipoprotéine D humaine. Le gène contient 5 exons dont le premier est non codant. Son promoteur présente plusieurs éléments régulateurs potentiels impliqués dans la modulation génique de l'apoD. L'exon 1 est représenté en italique. AP-1: Protéine activatrice 1, APP : Alternance de purines et de pyrimidines, APRE-2 et -3 : Élément de réponse de phase aiguë 2 et 3, E47 : Séquence reconnue par TAL-1, E2F : *Eearly adenovirus transcription factor*, GRE : Élément de réponse aux glucocorticoïdes, GC: Boîte GC, ERE : Élément de réponse à l'œstrogène, FSE : Élément spécifique aux acides gras, SRE: Élément de réponse au sérum, EBS : *Ets-binding site*, TATA : Boîte TATA, NFκ-B : Facteur nucléaire kappa B, PRE : Élément de réponse à la progestérone, STRE : Élément de réponse au stress, TβIE : Facteur de croissance transformant β, IRF-1 : Facteur régulateur de l'interféron, MZF-1 : *Myeloide zinc finger protein*, RFX : *X-box binding protein*, RORA1 : *Steroid hormone nuclear receptor (retinoic acid) alpha1*. La région entre les nucléotides -174 et -4 est responsable de l'expression basale, alors que la région -558 à -179 serait impliquée dans l'induction de l'apoD lors de l'arrêt de croissance. Un SRE, à proximité d'un EBS, est situé dans cette région et constitue un déterminant majeur de cette induction (Tirée de Do Carmo *et al.*, 2002).

Des études récentes sur le promoteur du gène de l'apoD, effectuées par l'équipe du Dr Rassart, démontrent qu'il existe des éléments importants impliqués dans la surexpression de l'apoD dans des situations de stress cellulaire. Ces études ont porté, plus particulièrement, sur des cellules fibroblastiques murines NIH/3T3 mises en arrêt de croissance par déprivation de sérum ou par confluence cellulaire, tel que mentionné dans la section 1.4.4 (Provost *et al.*, 1991; Rassart *et al.*, 2000; Do Carmo *et al.*, 2002). Ainsi, la région entre les nucléotides -174 et -4 du promoteur serait responsable de l'expression basale. Quant à la région entre les nucléotides -558 et -179, elle serait impliquée dans l'induction de l'expression de l'apoD lors de l'arrêt de croissance par déprivation de sérum. Ces résultats ont été démontrés par des expériences de délétion de différentes régions du promoteur de l'apoD et en mesurant l'activité promotrice de ces constructions grâce au gène de la luciférase (Do Carmo *et al.*, 2002). Dans la région entre les nucléotides -558 et -179, on retrouve la paire d'éléments de réponse au sérum (SRE1 et 2) de même qu'une région purine-pyrimidine (APP) capable d'adopter une conformation d'ADN-Z associée à l'activation et la répression de gènes de mammifères (Hamada *et al.*, 1984; Gilmour *et al.*, 1984). L'analyse par retard sur gel de ces éléments *cis*, excepté pour l'élément APP, révèle qu'ils sont spécifiquement impliqués dans l'induction de l'apoD en arrêt de croissance par interaction avec des protéines nucléaires, d'où l'importance de la présente étude. Effectivement, par retard sur gel, trois bandes spécifiques (A, B et D, en ordre croissant de vitesse de migration) apparaissent lorsque les extraits nucléaires provenant de cellules en croissance sont incubés avec les deux SREs (Do Carmo *et al.*, 2002; voir Figure 1.2). Dans la condition d'arrêt de croissance, la bande B est moins intense et une bande C, migrant plus vite, apparaît. Cette bande C contiendrait donc un complexe de facteurs nucléaires qui seraient responsables, en arrêt de croissance, de l'induction de l'apoD.

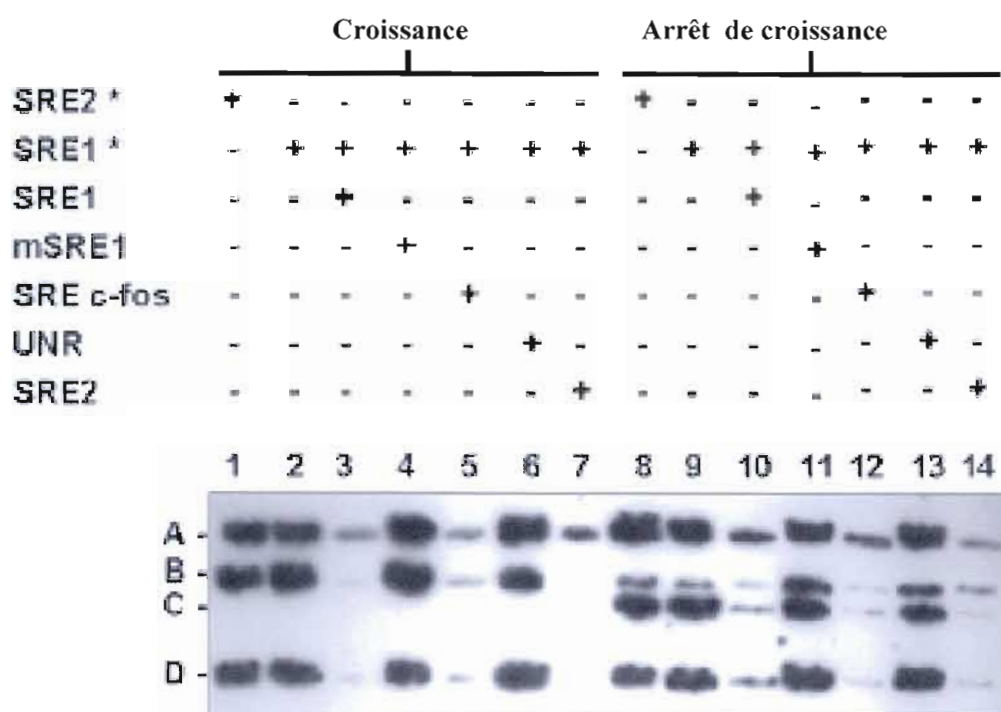


Figure 1.2. Retard sur gel des séquences SRE1 et 2 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extraits nucléaires provenant de cellules NIH/3T3. Les extraits nucléaires provenant de cellules en croissance (puits 1 à 7) et en arrêt de croissance après 4 jours de déprivation de sérum (puits 8 à 14) ont été incubés avec les SRE1* (puits 2 à 7 et 9 à 14) et SRE2* (puits 1 et 5). Les complexes formés sont indiqués avec les lettres A, B, C et D. Des tests de compétitions ont permis de vérifier la spécificité de la liaison avec l'ajout d'un excès de 25 fois d'oligos compétiteurs : SRE1, puits 3 et 10; mSRE1, puits 4 et 11; SRE *c-fos*, puits 5 et 12; UNR, puits 6 et 13; SRE2, puits 7 et 14. UNR : *unrelated*, * : oligo radiomarqué, mSRE1 : SRE1 muté, SRE *c-fos* : séquence SRE provenant du promoteur du gène *c-fos*. (Tirée de Do Carmo *et al.*, 2002).

1.5.2 Caractérisation du SRE et de la boîte CArG

1.5.2.1 L'élément de réponse au sérum (SRE)

Le SRE a été originellement décrit comme un élément de 23 pb ayant des répétitions inversées de symétrie dyade et dont la séquence est : $\overleftarrow{\text{aggatgtCCatattaGGacatct}} \overrightarrow{\text{ }}$ (Treisman, 1986 ; Miano, 2003). Le SRE serait lié de façon constitutive à un complexe de deux facteurs de transcription : le SRF et le TCF (Ramirez *et al.*, 1997) et ces trois éléments seront détaillés davantage dans la section 1.6.3.

1.5.2.2 La boîte CArG

La boîte CArG, pour sa part, est un élément cis de 10 pb qui ne présente pas de symétrie dyade, caractéristique du SRE. Cet élément a pour séquence consensus; $\text{CC(A/T)}^6\text{GG}$ et une seule mutation, habituellement une substitution au centre A/T par un C ou un G, est acceptée pour considérer cet élément cis comme « *CArG-like element* » (Miano, 2003). La boîte CArG est en fait le cœur du SRE, mais ces deux éléments sont tout à fait distincts l'un de l'autre. Plus de 60 gènes ont été fonctionnellement caractérisés, ont une ou plusieurs boîtes CArG au niveau de leur promoteur et interagissent activement avec des facteurs de transcription. La majorité de ces gènes ont été classés dans la catégorie de gènes associés aux muscles ou associés à la croissance (ex. : le c-fos; Latinkic *et al.*, 1996; Gille *et al.*, 1995).

1.6 Les facteurs de transcription

Il existe plus de 30 000 gènes dans le génome humain qui, selon les différentes combinaisons et niveaux d'expression, expliquent la présence de plusieurs types cellulaires. Parmi ces gènes, plus de 2000 codent pour des facteurs de transcription ; des protéines nucléaires essentielles à l'initiation de la transcription et qui sont associées à l'ARN polymérase. Ces facteurs de transcription sont en général des coactivateurs, corépresseurs, remodelers de chromatine, histones acétylases, déacétylases, kinases et méthylases. Ils contiennent deux domaines caractéristiques : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine

de régulation de la transcription. Lors de l'étude de facteurs de transcription, plusieurs questions peuvent être posées. Par exemple, est-ce qu'un facteur de transcription influence directement l'activité de transcription? Est-ce que le facteur, une fois synthétisé, se rend automatiquement au noyau pour agir sur la transcription? Si ce facteur requiert un signal pour être actif, quelle est la nature de ce signal? (Brivanlou et Darnell, 2002). Deux grandes classes peuvent être établies selon qu'ils exercent une action positive ou négative (Drewett *et al.*, 2001 ; Brivanlou et Darnell, 2002). Les facteurs de transcription ayant une action positive peuvent être classés selon qu'ils sont des facteurs nucléaires actifs de façon constitutive, comme par exemple le Sp1, la protéine liant la séquence CCAAT et le NF1 ou des facteurs de transcription régulateurs comme le p53, le facteur de réponse au sérum (SRF) de la famille des «*MADS box*» et le ELK-1 de la famille des «*E-twenty-six*» (ETS) incluant le facteur de complexe tertiaire (TCF pour «*ternary complex factor* »; Buchwalter *et al.*, 2004). Autrement dit, ce classement peut être établi sur la base de leurs rôles (voir Figure 1.3).

1.6.1 Rôles des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription actifs de façon constitutive sont des protéines présentes en permanence dans le noyau des cellules, et ce peu importe le type cellulaire. Ces protéines ne semblent pas être impliquées dans un changement d'activité transcriptionnelle d'un gène en particulier. Elles joueraient un rôle plus important dans la transcription de gènes qui semblent être toujours transcrits, c'est-à-dire ; les protéines structurales comme la tubuline et l'actine, et les enzymes métaboliques ubiquistes comme la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH ; Brivanlou et Darnell, 2002). Parmi les sous-classes de facteurs de transcription régulateurs, il y a celles dites cellules-spécifiques qui apparaissent comme des régulateurs dans le contrôle de la différenciation cellulaire, et celles dites signal dépendant. On retrouve dans cette dernière, les facteurs de transcription nucléaires dits résidents, sur laquelle une plus grande attention sera apportée étant donnée que le SRF et le TCF, pouvant agir directement sur l'induction de l'expression de l'apoD dans les cellules en arrêt de croissance, font partie de cette sous-classe.

1.6.2 Les facteurs de transcription nucléaires résidents

Plus d'une douzaine de cascades de phosphorylation agissent sur les résidus sérines d'une centaine de protéines nucléaires résidentes suite à un signal provenant de l'interaction d'un ligand et de son récepteur de surface cellulaire (Voet et Voet, 1998). Deux voies connues peuvent amener à la phosphorylation des protéines nucléaires résidentes par les cascades des sérines kinases. La première est celle où de petites molécules se lient à leurs récepteurs de surface cellulaire couplés aux protéines G. Ceci amène l'augmentation intracellulaire d'un second messenger comme l'adénosine 3',5'-monophosphate (AMPc), les phosphoinositols, le diacylglycérol (DAG) et le Ca^{2+} qui agissent directement sur les cascades des sérines kinases (Brivanlou et Darnell, 2002). La deuxième voie est celle où un ligand polypeptidique se lie à un récepteur cellulaire tyrosine kinase. Parmi les substrats des sérines kinases, on retrouve la famille des protéines ETS, la protéine liant l'élément de réponse au AMPc (CREB) et la famille des « *MADs box* ». Plusieurs de ces protéines nucléaires semblent être toujours liées à l'ADN à tout moment avant d'être activées suite à un stress cellulaire (Voet et Voet, 1998).

1.6.3 Les facteurs de transcription liant le SRE

Beaucoup d'études ont été effectuées sur les éléments cis SRE et la boîte CArG, retrouvés dans plusieurs promoteurs de gènes précoces, et notamment des gènes musculaires comme l'actine et la myosine. L'un des modèles les plus connus est le SRE du promoteur du proto-oncogène c-fos (Rech *et al.*, 1994 ; Treisman, 1986; 1990; 1992 ; Chai *et al.*, 2002). Cette séquence d'ADN est nécessaire et suffisante pour une induction rapide de l'expression de ce proto-oncogène en réponse à un signal cellulaire externe comme les hormones de croissance, le sérum et les esters de phorbol. L'activation totale du SRE nécessite la liaison du TCF (ou p62) et du SRF (ou p67) à leur site de liaison spécifique à l'ADN (Sharrocks, 2001). Beaucoup d'informations ont été accumulées sur l'étroite coopération entre ces deux facteurs de transcription.

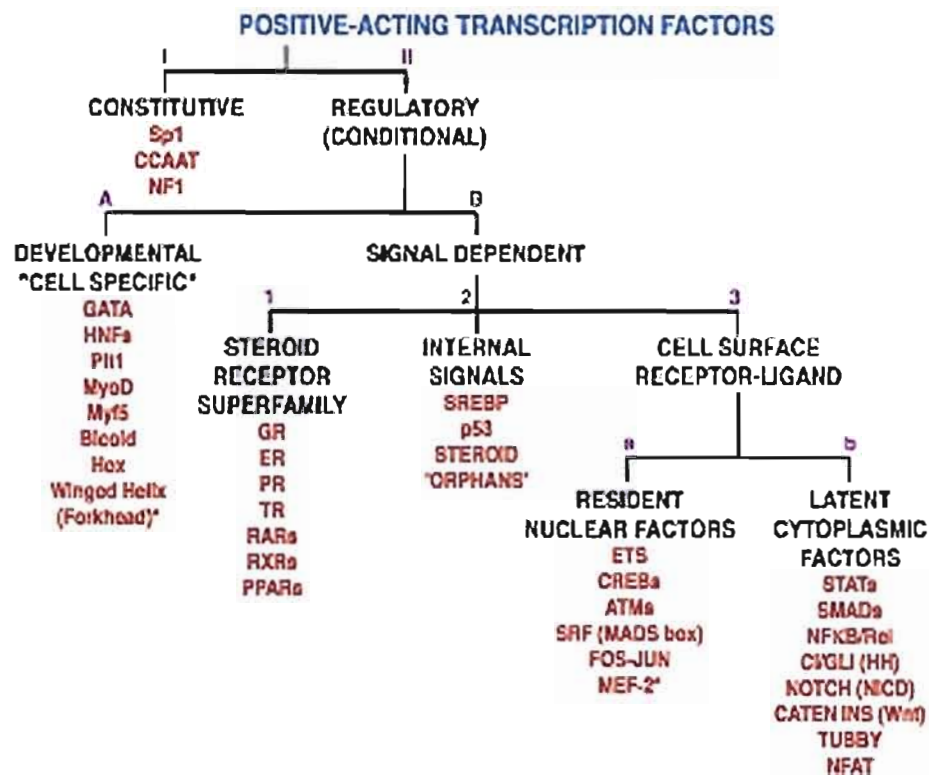


Figure 1.3. Classification fonctionnelle des facteurs de transcription ayant une action positive. Les sous-classes de facteurs de transcription sont montrées en noir et des exemples de facteurs de transcription sont illustrés en rouge. Les facteurs de transcription qui sont phosphorylés sur leurs résidus sérines sont indiqués par un astérisque (Tirée de Brivanlou et Darnell, 2002).

1.6.3.1 Le SRF

Le SRF est une protéine dimérique de 67 KDa faisant partie de la famille des « *MADs box* ». C'est un facteur de transcription ubiquiste reconnu pour lier le SRE et capable de recruter le TCF pour former le complexe tertiaire (TC pour « *ternary complex* » ; Sharrocks, 2001). Le SRF semble être localisé de manière constitutive dans la chromatine. Effectivement, des expériences ont démontré que le SRF est lié à l'ADN à tout moment du cycle cellulaire et qu'il est modifié intensivement par phosphorylation et par glycosylation immédiatement après sa synthèse (Chai *et al.*, 2002). La caséine kinase (CK) II reconnaît les mêmes sites de phosphorylation sur le SRF tant *in vitro* qu' *in vivo*. Cette phosphorylation, de même qu'un stress cellulaire induisant un arrêt de croissance ou après l'ajout d'hormone de croissance, ne semble pas affecter l'activité de liaison du SRF à l'ADN (Chai et Tarnawski, 2002), ce qui vient supporter l'idée que le SRF serait lié à l'ADN immédiatement après sa synthèse. Toutefois, Atadja et ses collègues (1994) ont montré que l'activité transcriptionnelle du SRF serait réprimée dans les fibroblastes humains en sénescence et que cette répression serait régulée par l'hyperphosphorylation du SRF, inhibant sa liaison au SRE. Sachant que l'apoD est induite spécifiquement dans les cellules fibroblastiques non-prolifératives, c'est-à-dire en quiescence et/ou en sénescence (Provost *et al.*, 1991), ce résultat laisse entrevoir que d'autres facteurs de transcription pourraient combler ce rôle régulateur.

1.6.3.2 Le TCF

Le TCF, quant à lui, est une protéine de 62 KDa et probablement le facteur de transcription le plus étudié parmi les membres de la famille des ETS. Il requiert la formation du complexe binaire; SRF-SRE (BC pour « *binary complex* ») pour lier le SRE (Sharrocks, 2001). Par contre, il peut lier par lui-même l'élément cis EBS (« *Ets Binding Site* ») qui a pour séquence soit CCGGA, soit CAGGA ou soit GGA (Fischer *et al.*, 1991 ; Nye *et al.*, 1992 ; Hahn et Wasylyk, 1994 ; Ramirez *et al.*, 1997). Il est connu dans la littérature que le TCF, communément appelé ELK1 (Latinkic *et al.*, 1996 ; Drewett *et al.*, 2001; Sharrocks, 2001) peut recruter le SRF à l'élément cis EBS-CAR_G qui ne lierait pas de SRF. Il est

important de mentionner que le SRF peut interagir avec d'autres facteurs de transcription ne provenant pas de la famille des ETS (ex.: NFkB, Sp1, GATA4, ATF6 et Pax-5; Sharroks, 2001 ; Chai *et al.*, 2002). Ainsi, il est possible que d'autres facteurs de transcription, connus ou non, autres que le SRF et le TCF puissent lier ces éléments cis. Finalement, dans la région -558 à -179, on retrouve un EBS et un GRE entre les deux éléments cis SRE (Do Carmo *et al.*, 2002).

1.7 Conclusion

L'apoD est une protéine impliquée, d'une façon ubiquiste, dans plusieurs processus biologiques normaux et pathologiques. La complexité de régulation de cette protéine par les différentes voies de signalisation, tant au niveau cellulaire que moléculaire, nécessite une étude de longue portée. Depuis sa découverte, de grandes avancées ont été réalisées, mais sa fonction physiologique demeure encore un mystère pour la communauté scientifique. La présente étude, basée sur l'interaction de facteurs de transcription avec les éléments cis déjà caractérisés, permettra d'enrichir notre compréhension de ces processus complexes de régulation du gène de l'apoD. De plus, les éléments cis SRE et EBS, retrouvés sur le promoteur du gène de l'apoD, jouent un rôle central dans la réponse cellulaire dans le cas de plusieurs gènes (plus d'une trentaine ; Chai *et al.*, 2002). Finalement, l'expression de l'apoD est modulée par l'arrêt de croissance (Do Carmo *et al.*, 2002). Il est donc très possible que cette modulation dépende de la liaison de facteurs de transcription au promoteur du gène. Le but de cette étude est de purifier ces protéines nucléaires et de les identifier par séquençage par spectrométrie de masse. La purification et l'identification de ces protéines nucléaires pourraient contribuer à dévoiler les mécanismes responsables de l'induction de l'ARNm de l'apoD, ainsi que sa fonction physiologique dans des conditions spécifiques comme dans la différenciation et dans l'arrêt de croissance cellulaire qui sont associés à plusieurs pathologies.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire et induction de l'arrêt de croissance

La culture d'une lignée cellulaire permettra d'obtenir des extraits d'ARNm totaux et protéiques. Par la suite, la modulation de l'expression génique de l'apoD et les interactions de facteurs nucléaires avec le promoteur du gène lors de l'arrêt de croissance seront analysées. Ainsi, la lignée cellulaire murine NIH/3T3 est mise en culture en présence de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10% de sérum de veau, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées dans une atmosphère de 5% de CO₂ à 37°C. Pour l'analyse des cellules en arrêt de croissance, la concentration du sérum est réduite à 0,2% après 50% de confluence. Pour l'extraction des ARN totaux, les cellules sont récoltées à différents jours d'incubation en déprivation de sérum. Pour l'extraction de protéines nucléaires, les cellules sont récoltées après 5 jours en déprivation de sérum.

2.2 Extraction des ARN totaux

Les cellules sont récoltées à différents jours en déprivation de sérum. À ces temps, les cellules sont récoltées avec le réactif TRIzol (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON.), une solution mono-phasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, et congelées à -80 °C. Pour l'extraction des ARN totaux, les cellules sont décongelées pendant 10 minutes (min) à la température de la pièce et 200 µl de chloroforme par ml de TRIzol sont ajoutés aux échantillons et mélangés vigoureusement. Par la suite, les échantillons sont incubés à la température de la pièce pour 3 min avant de les centrifuger à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. Ensuite, 0,5 ml d'isopropanol par ml de TRIzol est ajouté à la phase aqueuse pour précipiter

l'ARN. On laisse reposer les échantillons 10 min à la température de la pièce. Ensuite, on centrifuge à 12 000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 75%, puis resuspendu dans 10 µl d'eau sans RNase.

2.3 Dosage des ARN

Le dosage des ARN a été effectué en mesurant la densité optique à 260 et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Sachant que le ratio des densités optiques (260/280) permet de vérifier la pureté de l'échantillon et qu'une densité optique à 260 nm équivaut à 50 ng d'ARN/ µl, l'évaluation de la qualité et de la quantité d'ARN a été obtenue. Un ratio inférieur à 1,6 signifie que l'échantillon est contaminé par des protéines alors qu'un ratio situé entre 1,8 et 2,0 indique que l'échantillon est relativement pur (Sambrook *et al.* 1989).

2.4 Hybridation de type « Northern »

2.4.1 Gel d'agarose au formaldéhyde

La migration sur gel d'agarose permettra de séparer les molécules d'ARN selon leur taille et une coloration au bromure d'éthidium, une molécule fluorescente plane s'intercalant entre les bases, révélera les bandes d'ARN sur gel lorsque mis sous uv (Sambrook et Russel, 2001). Les échantillons d'ARN sont donc dosés par spectrophotométrie et sont ensuite chargés sur un gel d'agarose à 1% contenant 16,7% de formaldéhyde dans du tampon MOPS 1X (40 mM d'acide 3-N-morpholino-propanesulfonique ; 50 mM de NaOAc ; 5 mM d'EDTA). Chaque échantillon d'ARN (10 µg) est traité dans un milieu contenant 0,5X de MOPS, 17,5% de formaldéhyde, 50% de formamide et du bromure d'éthidium à 10 µg/ml pendant 15 min à 65°C avant le chargement. Après la migration de 4 heures (hres) à 100 V, le gel est lavé pendant 1 hre dans du 20X de SSC (3 M de NaCl et 300 mM de citrate de sodium), puis un transfert Northern est effectué, pendant la nuit, sur membrane de nylon (Osmonics) et fixé 5 min aux uv après que le transfert soit fini.

2.4.2 Marquage radioactif d'une sonde d'ADN

En rendant la sonde d'ADNc radioactive, il est possible de mettre en évidence les bandes d'intérêt par autoradiographie du gel (Sambrook et Russel, 2001). Les membranes sont hybridées avec des sondes radioactives de l'ADNc de l'apoD ainsi qu'avec une autre sonde référence correspondant à un gène ubiquiste et subissant peu de régulation, la GAPDH. Environ 20 ng d'ADNc dans 8 µl d'eau sont chauffés à 100°C pendant 5 min puis gardés sur glace pour garder l'ADN dénaturé. Par la suite, 30 µl d'un mélange (20 mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 0,25 mM de dGTP, de dCTP et de dTTP ; 8 mM de MgCl₂ ; 0,3 U d'amorce aléatoire (dXTP)₆ et 10 mM de DTT) sont rajoutés à l'ADN avec 20 µCi de (α³²P) dCTP et 10 U de Klenow ADN polymérase (Amersham Pharmacia Biotech). Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min et puis l'ADN est précipité à l'éthanol avec de l'ARNt à 1 mg/ml. Le culot est resuspendu dans 100 µl d'eau et la sonde est dénaturée à 100°C puis gardée sur glace avant de l'ajouter à la membrane pour l'hybridation (Feinberg et Vogelstein, 1983). Un volume de 2 µl est prélevé pour le compte de la radioactivité incorporée.

2.4.3 Hybridation et lavage des membranes

Les membranes d'ARN sont dans un premier temps pré-incubées dans 20 ml de tampon de pré-hybridation (Formamide à 50% ; 6X de SSC ; 5X de Denhardt's (0,1% de Ficoll 400 ; 0,1% de Polyvinylpyrrolidone ; 0,1% d'albumine de sérum bovin (BSA)) ; 0,5% de SDS ; 0,25 mg/ml d'ADN de sperme de hareng (préalablement dénaturé)) pendant 1 h à 42°C. Le tampon de préhybridation est retiré et remplacé par le tampon d'hybridation (Formamide à 50% ; 1M de NaCl ; 2,8X de Denhardt's ; 0,5% de SDS ; 10% de dextran sulfate ; 0,24 mg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé). Environ 1 000 000 de cpm de sonde radioactive par ml de tampon d'hybridation sont utilisées. L'hybridation se fait à 42°C pendant la nuit. Afin d'éliminer la radioactivité liée de façon non-spécifique, les membranes sont lavées dans 2X de SSC à la température de la pièce pendant 30 min suivit d'un autre lavage dans 2X de SSC contenant 0,1% de SDS à 65°C pendant 15 min. Si nécessaire, un lavage supplémentaire peut être effectué dans 0,1X de SSC contenant 0,1% de SDS. Les

membranes sont exposées sur des films (Kodak X-OMAT) à -80°C avec un écran intensifiant (Cronex Lighting Plus) pour la nuit ou sur des écrans (Kodak K-screen) pour PhosphorImager pendant 1 hre et analysé au densitomètre.

2.5 Extraction de protéines à partir de cellules en culture

2.5.1 Extrait cytoplasmiques (CYT)

Les cellules sont récoltées avec du tampon phosphate salin (PBS pour « *Phosphate-buffered saline* ») 1X en les centrifugeant à 300 g pendant 10 min. Le culot de cellules est resuspendu dans 5 volumes de tampon PBS à 4 °C et centrifugé à 300 g pendant 10 min. Les cellules sont resuspendues dans 5 volumes de tampon A (10 mM d'HEPES pH 7,9 ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 10 mM de KCl ; 0,5 mM de DTT) et incubées à 4 °C pendant 10 min. Après centrifugation à 300 g pendant 10 min, les cellules sont resuspendues de nouveau dans 2 volumes de tampon A, lysées avec un homogénéiseur Dounce (piston de type B) et centrifugées à 300 g pendant 10 min. Le culot de cette dernière étape, contenant les noyaux, sera traité dans la section suivante 2.5.2. Ensuite, 0,11 volume de tampon B (0,3 M d'HEPES pH 7.9 ; 1,4 M de KCL ; 0,03 M de MgCl₂) est ajouté au surnageant qui contient les protéines cytoplasmiques et appelé fraction S100. La fraction S100 est centrifugée à 100 000 g pendant 1 hre et le surnageant est dialysé contre 20 volumes de tampon D (20 mM d'HEPES pH 7,9 ; 20% de glycérol ; 0,1 M de KCL ; 0,2 mM d'EDTA ; 0,5 mM de PMSF ; 0,5 mM de DTT) pendant 5 hres.

2.5.2 Extrait nucléaire (NE)

Le culot de noyaux est centrifugé à 25 000 g pendant 20 min et resuspendu dans 3 ml de tampon C (20 mM d'HEPES pH 7,9 ; 25% de glycérol ; 0,42 M de NaCl ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM d'EDTA ; 0,5 mM de PMSF ; 0,5 mM de DTT)/ 10⁹ cellules et homogénéisé. La suspension est mélangée avec un barreau magnétique pendant 30 min et centrifugée à 25 000 g pendant 30 min. La suspension contenant les protéines nucléaires est dialysée contre 50 volumes de tampon D pendant 5 hres. Les 2 fractions sont de nouveau centrifugées à 25 000 g pendant 30 min et les surnageants sont récupérés, aliquotés et

congelés à -160 °C dans l'azote liquide. Toutes les étapes de cette manipulation sont effectuées à 4 °C (Dignam *et al.*, 1983). Le DTT et le PMSF sont ajoutés juste avant usage.

2.5.3 Extraction de protéines nucléaires par la « méthode rapide »

Cette méthode rapide permet d'obtenir des protéines nucléaires à partir d'un petit nombre de cellules. Les cellules (1 à 3 X 10⁶) cellules sont resuspendues dans 10 ml de tampon PBS et centrifugées à 1 500 g pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon PBS, transféré dans un eppendorf et centrifugé à 1 500 g pendant 15 secondes (sec). Le culot est de nouveau resuspendu dans 400 µl de tampon A (10 mM d'HEPES pH 7,9; 10 mM de KCl; 0,1 mM d'EDTA; 0,1 mM d'EGTA; 1 mM de DTT et 0,5 mM de PMSF) et mis sur glace pendant 15 min. Par la suite, 25 µl de Nonidet P (NP)-40 à 0,5% sont ajoutés et le tout est vortexé pendant 15 sec et centrifugé ensuite à 15 000 g pendant 30 sec. Le culot de noyaux est resuspendu dans 50 µl de tampon C (20 mM d'HEPES pH 7,9; 400 mM de NaCl; 1 mM de DTT; 1 mM d'EDTA; 1 mM d'EGTA et 1 mM de PMSF), vortexé pendant 15 sec, mélangé pendant 15 min et centrifugé à 11 000 g pendant 5 min. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré, aliquoté et conservé à -80 °C (Lahiri et Ge, 2000). Toutes les étapes de cette manipulation sont effectuées à 4 °C. Le DTT et le PMSF sont ajoutés juste avant usage.

2.5.4 Extraction de protéines brutes

Cette méthode ne sépare pas les protéines nucléaires des protéines cytoplasmiques. Toutefois, l'obtention des extraits bruts est rapide et à partir d'un petit nombre de cellules. Les cellules (1 à 10 X 10⁶) sont récupérées dans du tampon PBS et centrifugées à 1 500 g pendant 5 min. Le culot de cellules est resuspendu avec 100 µl de tampon A (10 mM d'HEPES pH 7,9; 140 mM de NaCl; 1,5 mM de MgCl₂; 0,5% de NP-40; 1mM de DTT; 1 mM de PMSF et 100 U/µL d'aprotinine), incubé sur glace pendant 5 min et centrifugé à 13 000 g pendant 5 min. Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80 °C. Toutes les étapes de cette manipulation sont effectuées à 4 °C. Le DTT, le PMSF et l'aprotinine sont ajoutés juste avant usage.

2.5.5 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford (BioRad) afin de déterminer la concentration des extraits. Les mesures ont été prises à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La courbe standard a été effectuée avec différentes concentrations de BSA.

2.6 Retard sur gel

Le retard sur gel est une technique qui permet d'analyser les interactions spécifiques entre des protéines et leurs sites de liaison à l'ADN. Cette technique implique l'addition de protéine à des oligonucléotides (oligos) ou fragments d'ADN marqués radioactivement, la migration des complexes formés par électrophorèse et la visualisation de l'ADN par autoradiographie. La liaison de la protéine réduit ainsi la mobilité électrophorétique de l'ADN, ce qui résulte en l'apparition de bandes distinctes correspondant à des complexes protéines-ADN (Sambrook et Russell, 2001). Les oligos doubles brins consistent en les séquences SRE (SRE1 : 5' TGA CTC CCA TTA GTG GAG TCA G 3' ou SRE2 : 5' CAT GTT CCA CTT CAG GAA ATG A 3') et la séquence non spécifique (UNR pour « *unrelated* » : 5' CCA AAC AGG ATA TCT GTA ATA AGC AG 3'). La première étape consiste en l'hybridation des oligos marqués avec leur brin complémentaire en mélangeant 50 ng d'oligos marqués radioactivement au ^{32}P avec 200 ng du deuxième brin complémentaire et en y ajoutant un tampon d'appariement 10X (50 mM de Tris-HCl pH 7,5; 1M de NaCl ; 100 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM d'EDTA et 1mM de DTT) pour un volume final de 100 μl . Après une incubation de 5 min à 90 °C, les tubes sont refroidis très lentement afin de permettre la renaturation de l'ADN. Les oligos double-brins sont mis en présence de 5 à 15 μg d'extrait nucléaire. Les extraits nucléaires proviennent de cellules fibroblastiques murines NIH/3T3 en culture soit en présence de sérum (10%) ou en déprivation de sérum (0,2%) pendant 5 jours. Le mélange réactionnel est constitué de 0,8 ng d'oligo marqué au ^{32}P , du tampon de liaison 10X (100 mM d'HEPES pH 7,9 ; 40% de glycérol ; 10% de Ficoll ; 250 mM de KCl ; 250 mM de NaCl ; 10 mM de DTT et 5 mM d'EDTA), de 0,25 μl de poly dI-dC à 2 mg/ml et de 0,5 μl de BSA à 20 mg/ml, et est incubé pendant 20 min à la température de la pièce dans

un volume total de 10 μ l. Du bleu de chargement (20% de Ficoll ; 0,2% de bleu de bromophénol, 0,2% de xylène cyanol) est ajouté et 8 μ l sont déposés sur gel d'acrylamide 6% non dénaturant d'une épaisseur de 0,75 mm dans 0,5X de tampon d'électrophorèse Tris-Borate-EDTA (TBE). Après une migration de 2 hres à 150V, le gel est séché et autoradiographié sur film Kodak. Deux formes de compétition permettent de vérifier la spécificité de la liaison, soit l'ajout d'un excès molaire de 100 fois du même oligo non radioactif, soit l'ajout d'un excès molaire de 100 fois d'un oligo non radioactif n'ayant aucune similitude avec la séquence étudiée, UNR. Par la suite, un deuxième gel est effectué où le mélange réactionnel contenant l'oligo radioactif, sans compétition est déposé dans le premier et le dernier puits. Dans les puits du centre sont déposés le même mélange contenant cette fois-ci l'oligo non radioactif, afin de pouvoir découper les bandes pour le séquençage en se fiant à la position de migration des bandes dans le premier et dernier puits. Une coloration au nitrate d'argent est aussi effectuée afin de vérifier la présence de protéines vis-à-vis des signaux de bandes de l'autoradiogramme.

2.7 Marquage radioactif des oligos

Le marquage radioactif des oligos est nécessaire afin de visualiser les complexes formés entre le SRE et les facteurs nucléaires. 50 ng d'oligos (brin sens) sont marqués dans un milieu réactionnel contenant du tampon T4 polynucléotide kinase 1X (10X : 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5 ; 0,1 M de $MgCl_2$; 50 mM de DTT, 1 mM de spermidine ; 1 mM d'EDTA pH 8,0), 50 μ Ci de γ dATP³²P et entre 10 et 15 U d'enzyme T4 polynucléotide kinase dans un volume final de 20 μ l. Après une incubation de 30 min à 37 °C, la réaction est arrêtée avec 2 μ l d'EDTA à 0,5 M. Les oligos radioactifs sont purifiés sur des colonnes microspin G-25 (Amersham Pharmacia; Feinberg et Vogelstein, 1983).

2.8 Purification et identification des protéines nucléaires

2.8.1 Purification des protéines nucléaires sur billes de fer couplées à la streptavidine

Les billes (500 µg; Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) sont resuspendues et incubées avec 1 500 pmoles d'oligos biotinylés pendant 15 min dans un tampon de resuspension (10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 1 M de NaCl et 1 mM d'EDTA). Les oligos biotinylés correspondent à la région -514 à -475 du promoteur de l'apoD (SRE1-EBS : 5' biotine-ATT ACC TGA CTC CCA TTA GTG GAG TCA GGA ACT CCA TGT T 3'). Les lavages sont effectués avec le même tampon et les billes incubées avec les extraits nucléaires (NE; ~500 µg) contenant 20 µl de tampon d'appariement 10X (50 mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 1 M de NaCl ; 100 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM d'EDTA et 1mM de DTT), 1 mg de BSA et 20 µg de PolyIdC dans un volume final de 200 µl. Après une incubation de 15 min à la température de la pièce, les billes sont lavées avec un tampon de lavage faible en sel (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 15% d'EDTA; 0,5% NP-40; 1 mM d'EDTA et 75 mM KCl) et éluées avec 30 µl de SDS à 0,1%. Le contrôle négatif (ctrl -) ne contient pas d'oligos biotinylés. Les protéines éluées sont déposées sur gel SDS-PAGE (12%) et migrées à 100 V pendant 1 hre. Après l'électrophorèse, le gel est retiré des plaques et coloré au nitrate d'argent.

2.8.2 Coloration au nitrate d'argent

Le gel est fixé avec une solution de fixation (50% de méthanol, 10% d'acide acétique) pendant 20 min (ou pour la nuit). Le gel est rincé dans 20% d'éthanol pendant 10 min et ensuite avec de l'eau, pendant 10 min. Le gel est ensuite réduit avec du thiosulfate de sodium 1X (0,2 mg dans 1 litre) pendant 2 min et rincé 2 fois avec de l'eau pendant 10 min (cette étape de rinçage est très importante!) afin d'enlever l'excès de thiosulfate de sodium. Par la suite le gel est incubé pendant 30 min avec du nitrate d'argent à 0,2% et rincé avec de l'eau pendant 20 sec. Le gel est incubé dans la solution de développement (3% de carbonate de sodium, 0,05% de formaldéhyde et 0,01% de sodium thiosulfate). Après l'apparition des bandes et l'intensité voulue (moins de 2 min), la réaction de développement est arrêtée avec de l'acide acétique (1-10%). Après le gel est lavé avec de l'eau. Les bandes désirées sont découpées et envoyées au centre de protéomique Génome Québec de l'Université McGill.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Induction génique de l'apoD en arrêt de croissance

Bien que ce résultat fut démontré antérieurement (Do Carmo *et al.*, 2002), il était important de vérifier la reproductibilité de l'induction génique de l'apoD en arrêt de croissance dans le temps et de s'assurer que, lors de l'extraction des protéines nucléaires, l'ARNm de l'apoD est surexprimé. Surtout, dans ce contexte où l'induction du gène de l'apoD est modulée lors de l'arrêt de croissance qui peut être provoqué par la déprivation de sérum et la confluence cellulaire (Provost *et al.*, 1991). Or, en négligeant la condition de confluence cellulaire, une induction précoce de l'apoD était observée atteignant des taux d'expression beaucoup plus rapidement qu'attendus (Fig. 3.1). Cette variation est imputable au fait que le % de confluence cellulaire observé était sous-estimé lors de la culture cellulaire en déprivation de sérum. De plus, l'arrêt de croissance cellulaire ne survenait qu'à partir du jour 2 en déprivation de sérum. Alors pour une sous-estimation de la confluence à 50%, qui serait probablement à 80%, les cellules proliféraient jusqu'à une confluence totale. Ainsi, l'induction précoce du gène de l'apoD, serait probablement due aux effets synergiques de ces deux conditions. Quoiqu'il en soit, il est probable que les facteurs de transcription impliqués dans la modulation de l'expression génique de l'apoD en arrêt de croissance, sont les mêmes dans les deux conditions. Les résultats obtenus par Northern en arrêt de croissance par déprivation de sérum uniquement, c'est-à-dire en évitant la confluence cellulaire, était comparable à celle obtenue dans la littérature (Fig. 3.2). L'induction de l'apoD apparaissait après 3 jours de déprivation de sérum pour atteindre un plateau au dixième jour. Pour les manipulations subséquentes, les cellules furent cultivées en déprivation de sérum lorsqu'elles

atteignirent une confluence de 50%. Les protéines furent donc extraites après 5 jours de déprivation de sérum.

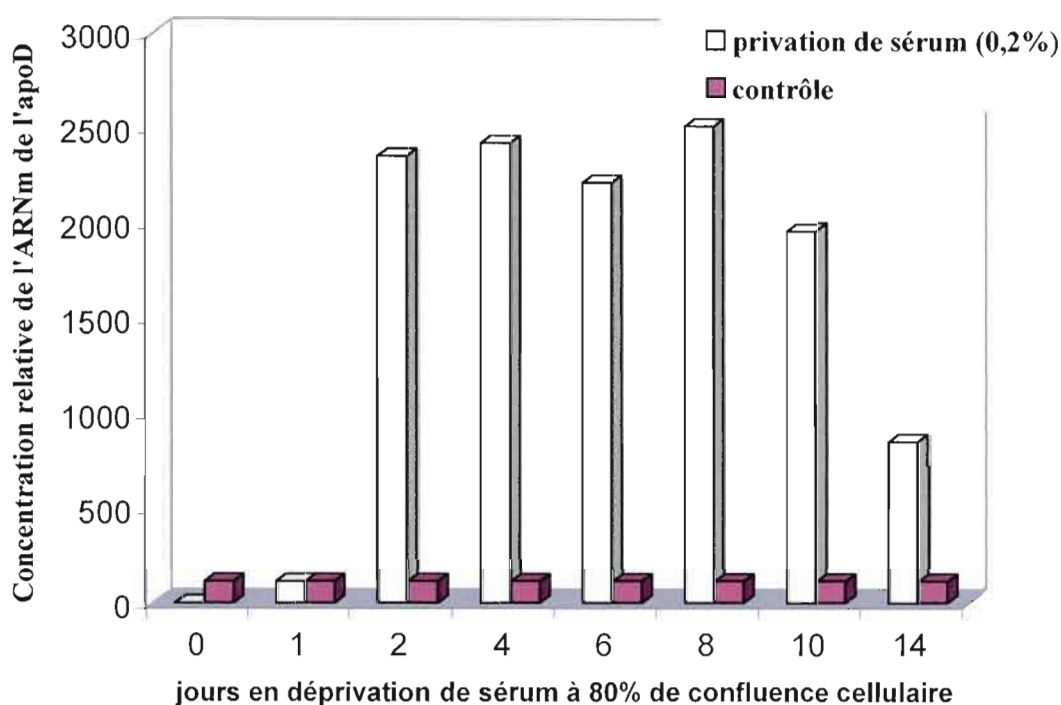


Figure 3.1. Induction de l'expression génique de l'apoD après deux jours dans les cellules NIH/3T3 en arrêt de croissance. Les cellules NIH/3T3 sont mises en arrêt de croissance par déprivation de sérum (0,2% de sérum bovin) et par confluence cellulaire (80%). Les ARNm totaux (10 µg) ont été migrés sur gel d'agarose (1%) et transférés sur membrane de Nylon. L'hybridation de la membrane avec les sondes radioactives d'ADNc du gène de l'apoD et du gène GAPDH a permis de doser l'expression relative de l'apoD. L'analyse a été faite avec un densitomètre. Le contrôle, représenté par les panneaux mauves, est l'expression de l'apoD dans les cellules en présence de sérum (10%) à 80% de confluence durant 24 hres (jours 0). Les panneaux jaunes représentent les niveaux d'expression de l'apoD dans les cellules privées de sérum à 80% de confluence à différents jours. Le contrôle est illustré aux jours 1 à 14 afin de comparer les niveaux d'expression de l'apoD aux différents jours de traitement.

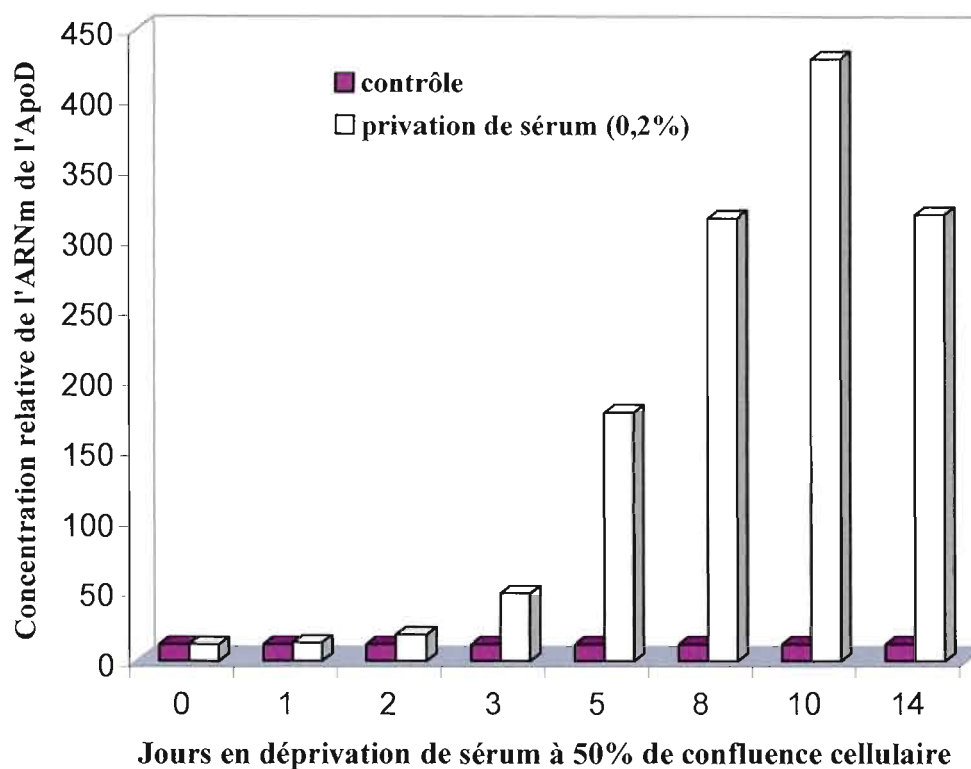


Figure 3.2. Induction de l'expression génique de l'apoD après trois jours dans les cellules NIH/3T3 en arrêt de croissance. Les cellules NIH/3T3 sont mises en arrêt de croissance par déprivation de sérum (0,2% de sérum bovin) à 50% de confluence cellulaire. Les ARNm totaux (10 µg) ont été migrés sur gel d'agarose (1%) et transférés sur membrane de Nylon. L'hybridation de la membrane avec les sondes radioactives d'ADNc du gène de l'apoD et du gène GAPDH a permis de doser l'expression relative de l'apoD. L'analyse a été faite avec un densitomètre. Le contrôle, représenté par les panneaux mauves, est l'expression de l'apoD dans les cellules en présence de sérum (10%) à 50% de confluence durant 24 hrs (jours 0). Les panneaux jaunes représentent les niveaux d'expression de l'apoD dans les cellules à 50% de confluence et privées de sérum à différents jours. Le contrôle est illustré aux jours 1 à 14 afin de comparer les niveaux d'expression de l'apoD aux différents jours de traitement.

3.2. Analyse de la liaison des séquences SRE du promoteur de l'apoD

D'après Do Carmo et ses collègues (2002), la séquence SRE serait spécifiquement impliquée dans l'induction de l'apoD. Certes, les premiers résultats obtenus par retard sur gel ne montrèrent pas le même profil de bandes et ce dans les mêmes conditions décrites dans la littérature (résultats non présentés). De plus, les profils électrophorétiques obtenus avec le SRE1 et SRE2 étaient légèrement différents, plus précisément au niveau de l'intensité des bandes (résultats non présentés). Selon la littérature, le SRE2, de même que le SRE situé dans la région -1132 à -1123 du promoteur de l'apoD (Do Carmo *et al.*, 2002) ne correspondraient pas à la définition de l'élément de réponse au sérum, c'est-à-dire; un élément de 23 pb ayant des répétitions inversées de symétrie dyade (Manio, 2003). Une analyse plus approfondie a permis de situer un autre SRE présent dans la région -1793 à -1769 sur le promoteur de l'apoD et ayant pour séquence : ct tca gct CCa tgg ttG Gcg act tc. Finalement, aucune boîte CArG n'est retrouvée au centre de ces SREs, à l'exception du SRE1 qui a été considéré uniquement lors des expériences de liaison avec les extraits, notamment pour la présence de bandes plus intenses qu'avec le SRE2. Étant donné ces faits, différentes méthodes d'extraction de protéines ont été utilisées afin d'obtenir un profil semblable à celui publié, considérant que la méthode d'extraction peut influencer le profil électrophorétique d'un retard sur gel (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.1 Liaison du SRE par des protéines extraites par la méthode rapide

Le retard sur gel avec les extraits bruts montre la présence d'une bande spécifique, vis-à-vis de la flèche noire, et de forte intensité dans les deux conditions : croissance et arrêt de croissance (Fig. 3.3). Une autre bande non spécifique est aussi observable, mais n'ayant pas migré dans les pores du gel et correspondant au niveau des puits (vis-à-vis de la flèche bleue). Ce fait est souvent constaté lors d'une expérience de retard sur gel où l'agglomération des protéines complexée à l'oligo radioactif confère un poids plus gros et ne permet pas la migration d'un tel complexe à travers les mailles d'un gel. L'agglomération peut être due à une trop grande concentration de protéines ou de sels provenant soit du tampon de liaison, soit du tampon d'extraction des protéines ou encore, d'excès de persulfate d'ammonium

(PSA) retrouvé au fond des puits suite à la polymérisation du gel (Sambrook *et al.*, 1989). Il est possible de se débarrasser de l'excès de PSA par une pré-électrophorèse, en mettant le gel sous tension un certain temps avant le dépôt des échantillons. Les puits 3 et 7 confirment que ces complexes formés au niveau des puits sont non spécifiques car on observe la perte du signal.

L'observation d'une seule bande spécifique, comparativement à trois bandes obtenues dans la littérature (voir section 1.5.1 et la Figure 1.2), peut être imputée au fait que la concentration des facteurs nucléaires, ayant leur action dans le noyau, soit diluée par les protéines cytoplasmiques contenues dans les extraits bruts. Cette dilution pourrait s'expliquer par le transport d'une protéine du cytoplasme vers le noyau suite à un signal, dans ce cas-ci; un stress cellulaire causé par la déprivation de sérum. Donc, ceci suppose que cette protéine est synthétisée même en condition normale (c'est-à-dire en présence de sérum permettant une croissance cellulaire) et irait directement au cytoplasme en attente d'un signal (arrêt de croissance par déprivation de sérum). Alors, en effectuant la réaction de liaison des extraits bruts avec les oligos, la protéine aurait donc accès au site de liaison contenu dans le SRE1, dans les deux conditions.

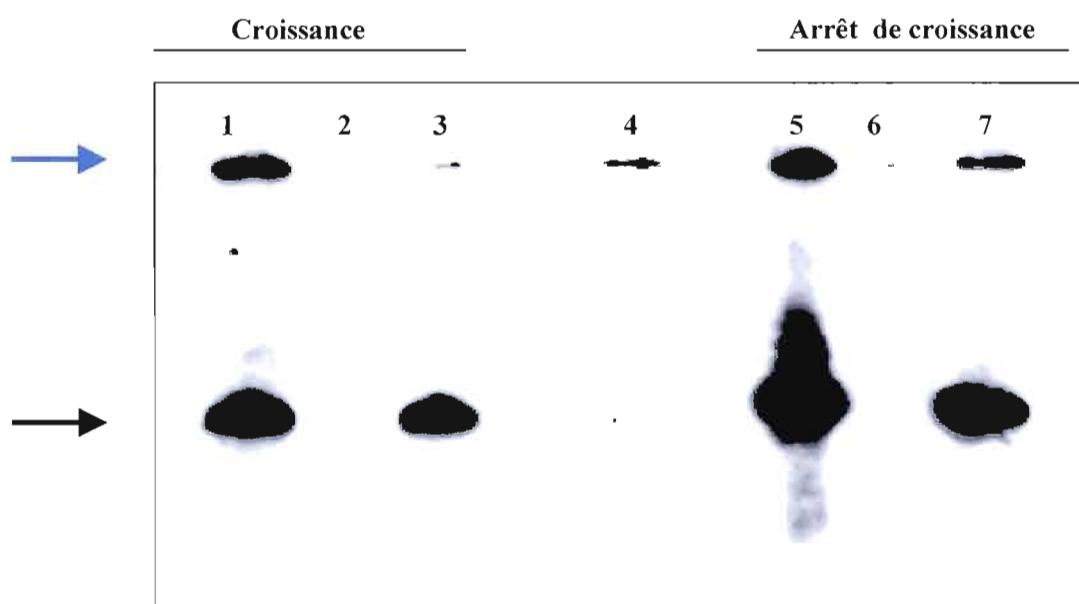


Figure 3.3. Retard sur gel de la séquence SRE1 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extrait brut provenant de cellules NIH/3T3 en croissance et arrêt de croissance. La bande spécifique, représentant le complexe formé avec la séquence SRE1, est indiquée avec une flèche noire. La bande non spécifique retrouvée au niveau des puits est indiquée avec une flèche bleue. Les puits 1 et 5 contiennent les extraits bruts provenant respectivement, de cellules en croissance et en arrêt de croissance. Les puits 2 et 6 contiennent un excès de 100 fois du même oligo non radioactif et les puits 3 et 7 contiennent un excès de 100 fois de l'oligo non spécifique et non radioactif. Le puits 4 contient le contrôle négatif, c'est-à-dire le SRE1 radioactif uniquement. Le bas du gel a été coupé ne permettant pas de visualiser les oligos non liés.

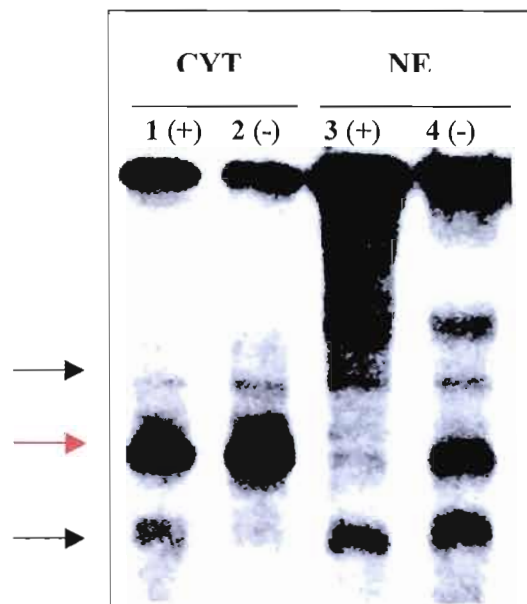


Figure 3.4. Retard sur gel de la séquence SRE1 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extraits provenant de cellules NIH/3T3 obtenus par la méthode rapide. Les puits 1 et 2 contiennent les extraits cytoplasmiques et les puits 3 et 4 contiennent les extraits nucléaires provenant de cellules en croissance et en arrêt de croissance. La flèche rouge illustre un complexe formé avec le SRE1 commun aux extraits cytoplasmiques et nucléaires à l'exception du puits 3. Les flèches noires illustrent les complexes formés avec le SRE1 dans les puits 1 et 2 et présents dans les puits 3 et 4 qui indiqueraient probablement une contamination de protéines nucléaires dans les extraits cytoplasmiques. CYT : extrait cytoplasmique, NE : extrait nucléaire, (+) : en croissance, (-) : en arrêt de croissance. Le bas du gel a été coupé ne permettant pas de visualiser les oligos non liés.

Avec les extraits nucléaires obtenus par « la méthode rapide », plusieurs bandes sont obtenues (Fig. 3.4), mais encore une fois avec un profil différent de celui escompté (voir Figure 1.2). Les différences constatées sont le nombre de bandes et la distance entre ces bandes. Toutefois, il serait important de mentionner qu'une différence est observée entre les deux conditions où la présence d'une bande supplémentaire est observable en arrêt de croissance dans le puits 4, comparativement au puits 3, dont la bande est de très faible intensité (indiquée vis-à-vis de la flèche rouge). En parallèle, les protéines cytoplasmiques ont aussi été utilisées (puits 1 et 2) afin de vérifier une quelconque régulation d'un facteur nucléaire entre le noyau et le cytoplasme. Tel que mentionné pour les extraits bruts, une

bande de forte intensité apparaît dans les extraits cytoplasmiques dans les deux conditions et semble correspondre à la bande supplémentaire ayant migrée à la même distance que celle dans le puits 4. Toutefois, aucuns tests de compétition n'ont été effectués puisque le profil électrophorétique ne concordait pas avec celui attendu ce qui ne peut confirmer la spécificité des complexes formés. Néanmoins, il est possible de spéculer que les deux faibles bandes apparaissant aussi avec les extraits cytoplasmiques (puits 1 et 2, vis-à-vis des flèches noires) puissent être une contamination de protéines nucléaires lors de l'extraction puisqu'elles sont présentes dans les puits 3 et 4. Eu égard à ces résultats, il a donc été décidé de poursuivre notre étude avec des extraits nucléaires obtenus selon méthode de Dignam (Dignam *et al.*, 1983), tel qu'effectué par Do Carmo et ses collègues (2002)

3.2.2 Liaison du SRE par des protéines extraites par la méthode de Dignam

L'autoradiogramme de la Figure 3.5 est composé de deux gels différents : premièrement, du puits 1 à 5, le gel non séché et exposé par autoradiographie à un film Kodak fût d'une heure. Les puits 2 et 4 présentent la migration d'un complexe formé en incubant le SRE1 avec les extraits cytoplasmiques provenant, respectivement, de cellules en croissance (CYT+) et en arrêt de croissance (CYT-). Cette étape est effectuée comme contrôle afin de vérifier la qualité de nos extraits et la régulation des complexes nucléaires du cytoplasme au noyau dans l'arrêt de croissance. Dans les puits 3 (NE+) et 5 (NE-), correspondant, respectivement, aux extraits nucléaires en croissance et arrêt de croissance, deux complexes sont formés, dont l'un est commun aux deux conditions et nommé CT (pour complexe tertiaire). L'autre complexe formé est spécifique à la condition cellulaire; soit en croissance, ayant migré plus bas (complexe binaire : CB), soit en arrêt de croissance, ayant migré plus haut (complexe quaternaire : CQ). La bande spécifique à l'arrêt de croissance (CQ) semble être la même que celle dans les puits 2 et 4, c'est-à-dire ; provenant du cytoplasme. Ce résultat est semblable à celui décrit auparavant (section 3.2.1) pour les extraits nucléaires obtenus par « la méthode rapide », ce qui peut expliquer la plus faible intensité de cette bande au niveau du puits 4 par rapport au puits 2. Autrement dit, le facteur

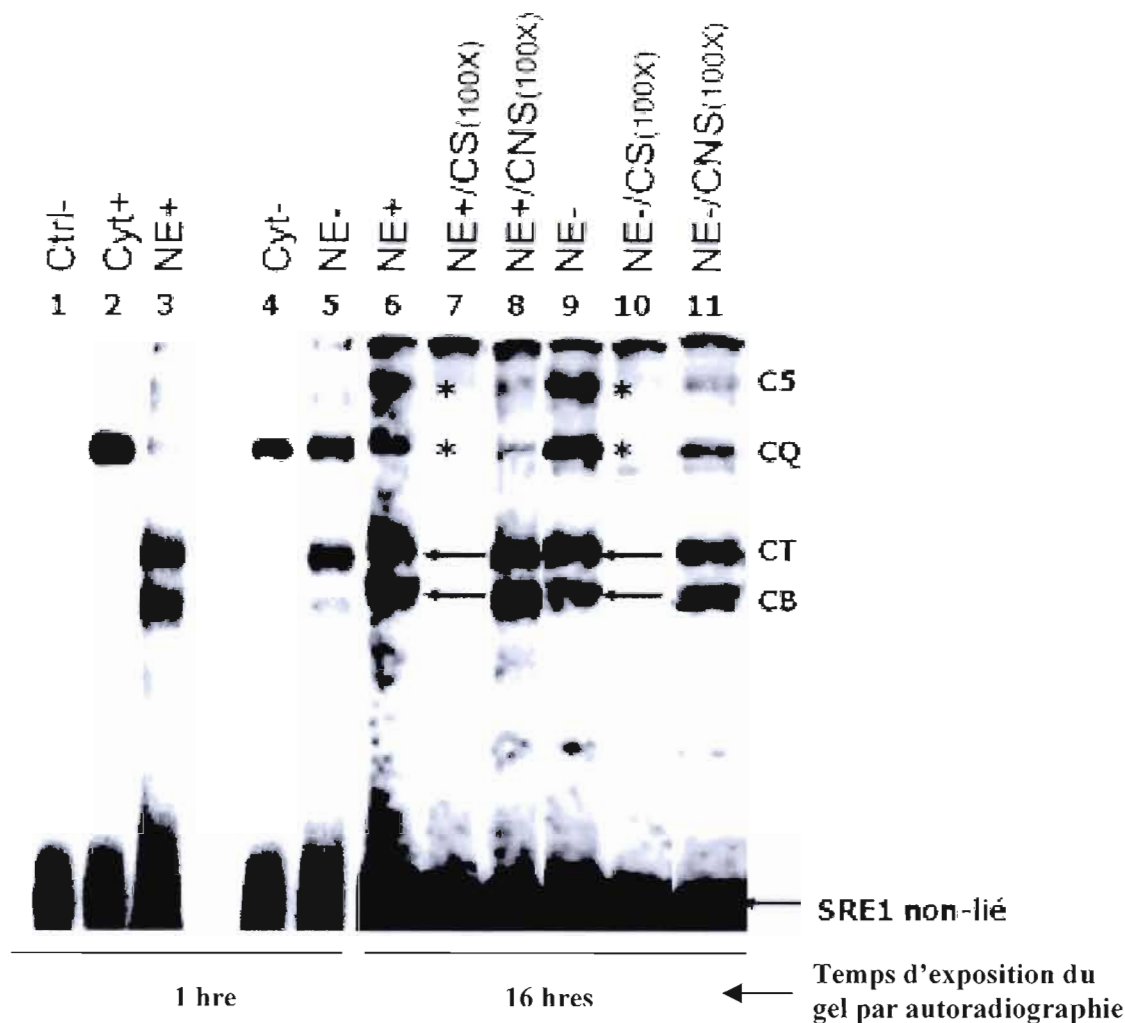


Figure 3.5. Retard sur gel de la séquence SRE1 du promoteur du gène de l'apoD en présence d'extraits provenant de cellules NIH/3T3 obtenus par la méthode de Dignam. Les gels ont été exposés par autoradiographie à un film Kodak durant 1 hre (puits 1 à 5) et 16 hres (puits 6 à 11). Pour l'exposition d'une heure, le gel n'a pas été séché. Des tests de compétitions ont permis de vérifier la spécificité de la liaison avec l'ajout d'un excès de 100 fois du même oligo non radioactif (CS/100X; puits 7 et 10), et l'ajout d'un excès de 100 fois d'un oligo non radioactif (UNR) n'ayant aucune similitude avec la séquence étudiée (CNS/100X; puits 8 et 11). Les complexes spécifiques et non spécifiques sont respectivement indiqués par des flèches noires et des astérisques. CYT : extrait cytoplasmique, NE : extrait nucléaire, (+) : en croissance, (-) : en arrêt de croissance, UNR : *unrelated*, CS : compétiteurs spécifiques, CNS : compétiteurs non-spécifiques, Ctrl- : contrôle négatif, CB : complexe binaire, CT : complexe tertiaire, CQ : complexe quaternaire.

présent dans le CQ ne serait pas abondant dans le noyau de cellules NIH/3T3 en croissance. Dans cette condition de prolifération, ce facteur, majoritairement cytoplasmique, serait quand même capable de lier l'oligo SRE1, tel qu'observé dans le puits2. Lorsque les cellules sont mises en arrêt de croissance, ce facteur cytoplasmique se dirigerait vers le noyau pour lier le CT avec une plus grande affinité (puits 5). Le CT contiendrait un autre facteur de transcription complexé au SRE1 peu importe la condition de prolifération. D'autres bandes apparaissent aussi dans les puits 3 et 5 mais avec une intensité plus faible. La présence de ces bandes CQ et C5 en condition de croissance et CB et C5 en condition d'arrêt de croissance indique une régulation des facteurs liants le SRE1 puisque leur intensité varie selon la condition. Il est possible que le facteur contenu dans la bande CB a une plus faible affinité pour le SRE1 en condition d'arrêt de croissance et de même pour la bande CQ en condition de croissance. En ce qui concerne la bande C5, celle-ci semble non-spécifique aux conditions de prolifération, vu qu'elle est de faible intensité dans les deux conditions et paraît aussi non-spécifique au SRE1 tel que démontré par des tests de compétitions et discuté dans le paragraphe suivant.

Deuxièmement, du puits 6 à 11, le gel fut séché et exposé par autoradiographie à un film Kodak durant 16 hres. Ces expériences montrent la spécificité des complexes pour l'oligo SRE1. Certaines bandes apparaissent avec une plus forte intensité, par exemple le C5, montrant un même profil de migration pour les deux conditions (puits 6 : NE+ et puits 9 : NE-). Ceci est probablement dû à l'exposition plus longue. Les tests de compétitions montrent que certaines bandes sont non-spécifiques (vis-à-vis des astérisques). Toutefois, la détection du CB dans les puits 9 et 11 en condition d'arrêt de croissance et après l'ajout respectif de compétiteurs spécifiques (CS) et non-spécifiques (CNS) suggère que ce complexe serait spécifique au SRE1. De plus, en ce qui concerne le CQ, l'intensité est fortement réduite en présence de CNS (puits 11) indiquant qu'il serait non-spécifique. L'intensité plus faible de cette bande peut s'expliquer par une interaction aspécifique de ce facteur avec le CNS dont la séquence est : 5' **CCA** **AAC** **AGG** ATA TCT GTA ATA AGC AG 3'. L'analyse de l'oligo CNS montre que la séquence du compétiteur non-spécifique a probablement été mal choisie puisque sa séquence contient des nucléotides importants du SRE et mis en caractère gras. De plus, la région soulignée montre une région riche en purines

qui est une caractéristique de la boîte CArG. Donc, le choix d'un compétiteur non-spécifique est très important. Ainsi, l'ajout d'un excès molaire de ce CNS pourrait affecter la formation du CQ. Finalement, la disparition plus importante du C5 en présence de compétiteurs montre clairement que celui-ci est non-spécifique quoiqu'on voit encore une faible bande. Dans ce cas le même raisonnement que ci-dessus pourrait s'appliquer.

3.3 Purification des protéines liant le SRE sur retard sur gel

Malgré cette optimisation du profil électrophorétique des bandes obtenues pour les différentes méthodes d'extraction, celle-ci ne concorde pas avec la littérature. Toutefois, ces étapes ont permis de constater que la formation des complexes liants le SRE1 nécessite une méthode d'extraction de protéines nucléaires et non d'extraits bruts. Ainsi, une bande spécifique à l'arrêt de croissance apparaît (puits 5; Fig. 3.5) et contiendrait donc un complexe de facteurs nucléaires responsables de l'induction de l'apoD. Il a été prévu de purifier les bandes obtenues directement à partir du gel (Fig. 3.5). En essayant de purifier les bandes correspondantes, la coloration au nitrate d'argent du retard sur gel n'a pu détecter les protéines contenues dans ces complexes, probablement à cause d'une trop faible quantité de celles-ci (résultat non montré). Alors une alternative a été employée afin de purifier ces complexes.

3.4 Purification des protéines nucléaires sur billes de fer couplées à la streptavidine

Afin de purifier les facteurs nucléaires liant de façon spécifique le SRE1, les extraits nucléaires provenant de cellules NIH/3T3 en croissance et en arrêt de croissance ont été incubés avec des billes de streptavidine couplées à l'oligo biotinylé; SRE1-EBS. Cette séquence SRE1-EBS correspond à la région -514 à -475 du promoteur de l'apoD et contient le SRE1 et un EBS distancé de 3 nucléotides. Le EBS a été considéré dans la séquence biotinylée et double brin puisqu'il est connu pour coopérer étroitement avec le SRE. Effectivement, une analyse bioinformatique montre que le promoteur du gène de l'apoD contient plus de 340 éléments cis sur le promoteur de l'apoD (allant de -2128 à +66). Plus de

16 EBS, ayant pour séquence ; CAGGA ou CCGGA/T, sont aussi retrouvés dans cette région du promoteur (voir Tableau I).

Tableau I. Sites et orientation de l'élément cis : « Ets-Binding-Site» (EBS), retrouvés sur le promoteur du gène de l'apoD, dans la région -2128 à +66 et ayant pour séquence CCGGA/T ou CAGGA.

PROMOTEUR	SÉQUENCE EBS	POSITION	ORIENTATION
ApoD (-2128 à +66)	TCCTG	-2208 à -2203	-
	TCCTG	-2100 à -2296	-
	TCCTG	-1483 à -1479	-
	CAGGA	-1422 à -1418	+
	AGGCC	-1326 à -1322	-
	CAGGA	-1307 à -1302	+
	CAGGA	-1014 à -1010	+
	TCCTG	-956 à -952	-
	TCCTG	-605 à -601	-
	CAGGA	-600 à -597	+
	CAGGA	-593 à -582	+
	CAGGA	-572 à -568	+
	GTCCT	-472 à -468	+
	TCCTG	-167 à -163	-
	AGGCC	-157 à -153	-
	AGGCC	-8 à -4	-

Les protéines éluées avec du SDS (0.1%) ont été migrées sur gel SDS-PAGE (Fig. 3.6). Par la suite, les bandes colorées au nitrate d'argent ont été excisées, digérées à la trypsine et les peptides tryptiques ont été séquencés par LC Qtrap MS/MS au Centre Génome Québec de l'Université McGill. Les protéines ont été identifiées en corrélant la masse des peptides tryptiques aux valeurs théoriques retrouvées dans des banques de données de NCBI, SwissProt et MSDB, en utilisant le programme Mascot. Les bandes ont été numérotées sur la photo du gel et choisies selon qu'elles étaient spécifiques aux conditions expérimentales par rapport au contrôle, ce qui permettait d'éliminer les protéines non-

spécifiques, c'est-à-dire, celles liant les billes de streptavidine. Certaines bandes ont été choisies à cause de leur intensité plus forte comparativement à la situation contrôle, et ce, malgré le fait qu'elles se retrouvaient dans le contrôle (bande 1, 2 et 3). Sachant qu'une même concentration d'extrait nucléaire a été utilisée dans les deux cas, il est probable qu'une protéine non spécifique migre au même endroit que notre protéine d'intérêt.

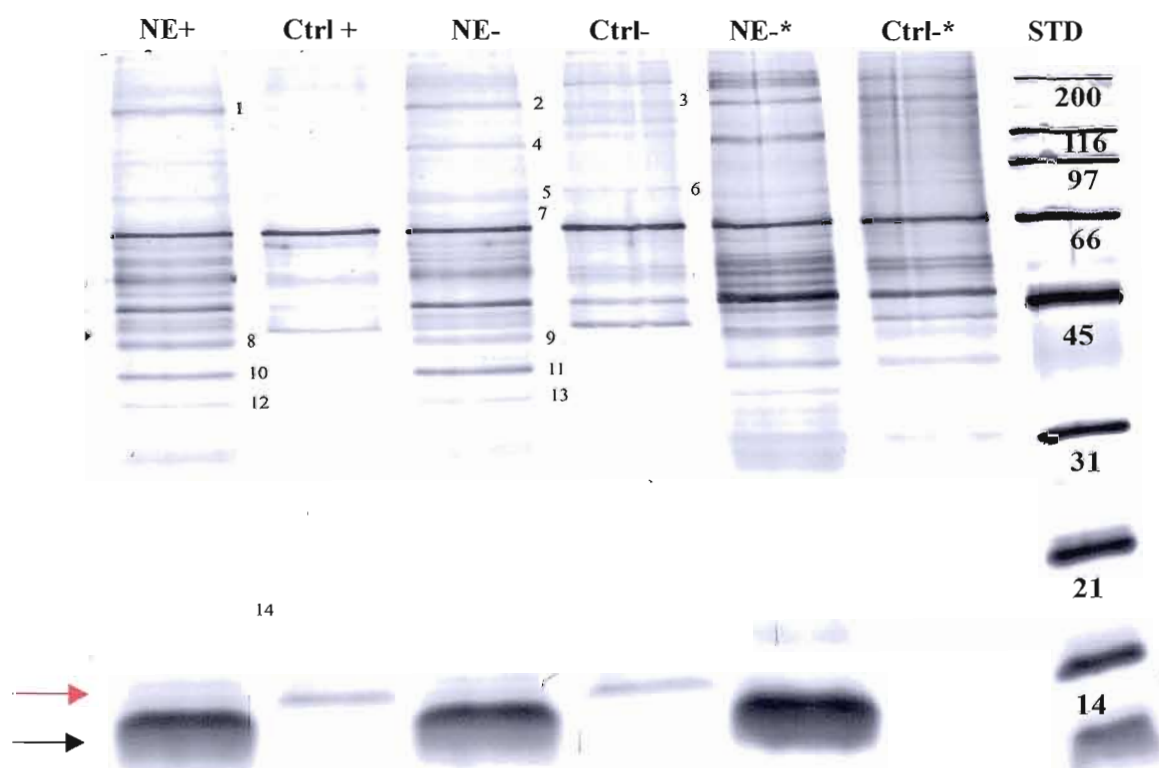


Figure 3.6. Purification des protéines nucléaires sur billes de fer couplées à la streptavidine. Après une incubation des billes avec les oligos biotinylés et les extraits nucléaires, les protéines sont éluées avec du SDS à 0.1% et migrées sur gel SDS-PAGE (12%). La coloration au nitrate d'argent a permis la visualisation des bandes. Les bandes numérotées de 1 à 14 ont été excisées du gel et séquencées par LC Qtrap MS/MS au Centre Génome Québec de l'Université McGill. L'oligo biotinylé et la streptavidine sont respectivement indiqués vis-à-vis des flèches noire et rouge. (+): condition de croissance; (-): condition d'arrêt de croissance; NE: extrait nucléaire; Ctrl: (contrôle) incubation des extraits avec les billes sans l'oligonucléotide biotinylé; STD: Standard de poids moléculaire; *: Le NE- et Ctrl- ont été effectués en duplicata.

Tableau II. Peptides séquencés par spectrométrie de masse (MS/MS) de bandes excisées du gel SDS-PAGE 12% (Figure 3.6). Le score, de la colonne 3, est le total des valeurs attribuées à chaque peptide tryptique. La valeur en dehors de la parenthèse de la colonne 4 correspond aux nombres de peptides tryptiques significatifs ayant confirmé l'identité de la protéine par homologie de séquence. Le numéro (no.) d'accension permet de retrouver le séquençage des protéines dans les banques de données. Les bandes 3 et 6 du contrôle de même que la bande 2 ne sont pas retenues car elles contiennent les protéines non-spécifiques.

BANDES DU GEL	TENTATIVE D'IDENTIFICATION DE PROTEINES	SCORE	PEPTIDES TRYPTIQUES	NO. D'ACCESSION
1 (NE+)	K1F4	68	1(3)	Q80YP3MOUSE
4 (NE-)	hnRNP U	244	5(9)	gi 7949051
	PARP-1	153	3(4)	gi 15080598
	Ahank protein	107	2	gi 26251953
	Ribosome-binding protein 1	195	3(6)	gi 23822106
5 (NE-)	Interferon-activatable protein 204	205	3(5)	gi 109501
7 (NE-)	Sept9 protein	248	3(6)	gi 28204888
	Kinesin family member C1	151	2(3)	gi 4050097
	78 KDa glucose- regulated protein	81	1(2)	gi 1304157
	Hsp70 isoforme 2	58	1(2)	gi 109946
	Intracellular protein Mg11	41	1	gi 2137851
8 (NE+)	hnRNPA/B (MSDB) ou CBF-A (SwissProt)	243	4(7)	gi 6754222
	Similar to hnRNP A3	137	3(4)	gi 12845960
	Mitotic checkpoint protein BUB3	97	1(3)	gi 5020213
	GTP-binding protein DRG	89	2	gi 346685
	Septin-5	86	1(3)	gi 6685763
	ATP synthase beta-subunit	65	1(2)	gi 2623222
	Apoptosis-inducing factor (AIF)	46	1	gi 24418885
9 (NE-)	Mitotic checkpoint Protein BUB3	271	5(6)	gi 5020213
	hnRNPA/B (MSDB) ou CBF-A (SwissProt)	199	3(6)	gi 6754222
	hnRNP A3 variant a	206	2(9)	gi 34327777
	Sept 5 protein	197	3(4)	gi 62871628
	A+U-rich RNA- binding protein ou hnRNP D	164	3(4)	gi 2137113
	Tial1 protein	138	2(3)	gi 14714709
	Septin 2	115	2(4)	gi 6754816
	GTP-binding protein DRG	107	1(2)	gi 346685
	Poly(rC) binding protein 1	100	2	gi 62751650
10 (NE+)	Apurinic/aprimidinic endonuclease 1	201	1(6)	gi 6753086
	hnRNP A/B	104	2	gi 6754222
	Similar to hnRNP A3 protein	102	2(3)	gi 12845960
11 (NE-)	hnRNP A2/B1/B0	213	3(5)	gi 23266713
	Similar to hnRNP A3 protein	131	2(5)	gi 12845960
	A+U-rich RNA- binding protein ou hnRNP D	47	1	gi 2137113
13 (NE-)	Similar to hnRNP A1	168	2(3)	gi 51770817
	hnRNP A2/B1 isoforme 1	109	2(3)	gi 7949053
	Nuclear factor 1	61	1	gi 110759
	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	41	1	gi 31980689
14 (NE-/+)	Apurinic/aprimidinic endonuclease 1	77	1(2)	gi 6753086
	hnRNP A2/B1	38	1	gi 263370

Tableau III. Liste des protéines identifiées en condition de croissance (NE+) et d'arrêt de croissance (NE-) et leurs séquences en a.a. des peptides tryptiques obtenus par MS/MS. Cette liste de protéines correspond à celles illustrées en jaune dans le Tableau II. Ces protéines ont été retenues en fonction de leur score principalement.

BANDES DU GEL	TENTATIVE D'IDENTIFICATION DE PROTEINES	% DE RECOUVREMENT (%)	SCORE	PEPTIDES TRYPTIQUES
1 (NE+)	KIF4	2	68	R.IILTEQANEK.M
4 (NE-)	hnRNP U	7	40	K.FIEIAAR.K
			67	K.NGQDLGVAFK.I
			42	K.VSELKEELK.K
			53	K.LLEQYKEESK.K
			26	K.DLPEHAVLK.M
8 (NE+)	PARP-1	4	31	K.AEPGEVVAPK.G
			38	K.ECSGQLVFK.S
			64	K.KPPLLNNADSVQAK.V
			42	R.GFGFILFK.D
			45	K.FGEVVDCTIK.M
9 (NE-)	hnRNP A/B ou CBF-A	19	55	K.EVYQQQQYGSGR.G
			75	K.IFVGGLNPEATEEK.I
			47	K.FGEVVDCTIK.M
			47	K.EVYQQQQYGSGR.G
			75	K.IFVGGLNPEATEEK.I
	hnRNP A/B ou CBF-A	16	54	K.VYTLVSGDR.L
			56	R.LYDVPANSMR.L
			69	K.QGYVLSSIEGR.V
			36	K.LNQPPEDGISSVK.F
			57	R.TPCNAGTFSQPEK.V
	BUB3	17		

Ainsi plusieurs protéines nucléaires ressortent de l'analyse du séquençage. Ces résultats sont basés sur le score obtenu pour chaque fragment tryptique, leur implication dans la régulation génique et/ou dans la prolifération cellulaire rapportée dans la littérature. Chaque peptide ayant permis l'identification de cette protéine se voit attribuer un score et lorsque la valeur de ce score est assez élevée (plus de 40), cela permet de confirmer l'identité de la protéine. Si cette valeur est plus faible, entre 30 et 40 en général, ce score confirme l'homologie de séquence avec la protéine. Dans le cas d'une valeur trop faible, ce peptide ne peut être considéré pour l'identification de la protéine contrairement aux deux critères précédents. De cette liste de protéines présentée dans le Tableau II, trois sont reconnues pour

interagir directement avec des éléments cis sur le promoteur d'un gène et jouant un rôle dans la régulation transcriptionnelle, notamment hnRNP A/B ou CBF-A et hnRNP U de la famille des « *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* » et PARP-1 de la famille des « *Poly (ADP-ribose) polymerase* » (Kamada et Miwa, 1992; Mikheev *et al.*, 2000 ; Dean *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005). Le PARP-1 serait un candidat potentiel interagissant aussi directement avec plusieurs membres de la famille des « *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* » (Gagné *et al.*, 2003). Finalement, le Kif4 et le BUB3 ont aussi été retenus pour leur interaction avec le PARP-1 et leur rôles dans la prolifération cellulaire (Saxena *et al.*, 2002; Midorikawa *et al.*, 2006).

3.5 Analyse du séquençage des protéines nucléaires purifiées

3.5.1 Le PARP-1

Les 4 peptides tryptiques assignés à l'identification de cette protéine représentent 4% de recouvrement en a.a. de PARP-1 murin, avec un score total, pour ces 4 peptides, de 153. De l'analyse des peptides tryptiques, un seul avait un score assez élevé de 64 et deux avaient des scores de 31 et de 38. Son PM apparent est de 116 KDa et concorde avec celui rapporté dans la littérature (Rouleau *et al.*, 2004). Finalement, le PARP-1 serait associé uniquement à l'arrêt de croissance.

3.5.2 Les protéines hnRNP A/B ou CBF-A

Plusieurs peptides tryptiques ont été assignés au hnRNP A/B ou CBF-A tant dans les conditions de croissance que d'arrêt de croissance et ce pour plusieurs bandes envoyées pour le séquençage et ayant des PM différents, notamment, pour les bandes 8 (NE+); 9 (NE-); 10 (NE+); 11 (NE-); 13 (NE-) et 14 (NE+). Les scores les plus élevés sont attribués aux bandes 8 et 9 avec des valeurs respectives de 243 et 199. Pour la bande 8, 4 peptides tryptiques sur 7 confirment l'identité de la protéine avec des valeurs supérieures à 40, et 19% de recouvrement en a.a. de la protéine identifiée. Pour la banque de donnée MSDB et SwissProt, le résultat de la recherche identifie aussi la protéine séquençée comme le « *CAR-G-Box Binding Factor A* » (CBF-A), une protéine faisant partie de la famille des hnRNPs et

originellement définie pour sa capacité à interagir avec la boîte CArG (Weisman *et al.*, 2002; Mikheev *et al.*, 2000). Dans la littérature, le hnRNP A/B et le CBF-A seraient la même protéine et ces deux noms sont couramment employés. Ceci porte à confusion puisqu'il existe d'autres protéines nommées aussi hnRNP A/B avec plusieurs variantes comme le hnRNP A2/B1 ou le hnRNP A2/B1/B0.

Pour la bande 9, 3 peptides tryptiques sur 6 confirment l'identité de la protéine avec des valeurs supérieures à 40 et 16% de recouvrement en a.a. de la protéine identifiée. Comme mentionné pour le résultat de la recherche de la bande 8, celle-ci ne fait aucune distinction entre le hnRNP A/B et le CBF-A.

Le hnRNP A/B ou le CBF-A est aussi identifié dans la bande 10 avec un PM apparent de 37 KDa sur gel SDS-PAGE (Fig. 3.6). Les membres de la famille des hnRNPs sont connus pour subir des épissages alternatifs donnant lieu à plusieurs isoformes. Le CBF-A se retrouverait sous 2 isoformes avec des PM de 37 et 42 KDa respectivement nommés p37 et p42 (Dean *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005). Ainsi, ceci pourrait expliquer le fait de retrouver les variantes des protéines de la famille des hnRNPs dans les bandes 8 à 14 dont le hnRNP A1 (bande 13), le hnRNP A3 (bande 8, 9 et 10), le hnRNP A2/B1/B0 (bande 11) de même que l'isoforme hnRNP D (bande 9). Plus de 20 membres de protéines de cette famille ont été identifiés (Kajita *et al.*, 1995; Pancetti *et al.*, 1999; Patry *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2005) et les lettres A à U leur ont été assignées, tout en sachant que chaque membre pourrait avoir plusieurs isoformes provenant d'épissage alternatif et ayant des PM différents (Kajita *et al.*, 1995), comme le hnRNP A/B. Cela pourrait expliquer leur présence dans plusieurs bandes. Finalement, 4 isoformes sont décrites dans la littérature pour le hnRNP D avec des PM de 37, 40, 42 et 45 KDa et les deux isoformes du CBF-A mentionnés précédemment, à savoir le p37 et le p42 correspondraient possiblement aux variantes du hnRNP D (Dean *et al.*, 2002; Ahmad et Lingrel, 2005).

3.5.3 Le hnRNP U

La bande 4 représente le hnRNP U, avec 5 peptides tryptiques sur 9 confirmant l'identité de cette protéine pour un score total de 244 et 7% de recouvrement de sa séquence en a.a.. Son PM apparent est d'environ 115 KDa sur le gel de la Figure 3.6 et est en accord avec celui rapporté dans la littérature variant entre 90 et 120 KDa, dépendamment des différentes formes phosphorylées (Kiledjian et Dreyfuss, 1992; Ahmad et Lingrel, 2005). Aucune autre isoforme de cette protéine n'a été décrite dans la littérature à part celles se rapportant à ses taux de phosphorylation, ce qui expliquerait sa présence uniquement dans cette bande. Par ailleurs, contrairement au CBF-A, le hnRNP U se retrouve seulement dans les extraits provenant de cellules en arrêt de croissance, ce qui fait de cette protéine, de même que le PARP-1, des candidats potentiellement impliqués dans la surexpression de l'apoD en arrêt de croissance.

3.5.4 Le Kif4

Un seul peptide tryptique a été assigné au Kif4 (bande 1) dans la condition de croissance avec un score de 59 et représentant 2 % de recouvrement en a.a. de cette protéine. Son PM apparent est d'environ 150 KDa sur le gel de la Figure 3.6 comparable à celui rapporté dans la littérature, qui est de 140 KDa (Hirokawa, 1998). Le Kif4 est une protéine associée aux microtubules et spécialisée dans le transport de complexes de protéines et d'ARNm (Midorikawa *et al.*, 2006).

3.5.5 Le BUB3

Finalement, cinq peptides tryptiques confirment l'identité de la protéine BUB3 avec un score de 271 et 17 % de recouvrement en a.a.. Son PM théorique est de 40 KDa (Saxena *et al.*, 2002) et correspond au PM apparent de la bande 9 sur le gel de la Figure 3.6. Le BUB3 est un composant du point de contrôle de l'axe mitotique et associé au centromère à des moments spécifiques du cycle cellulaire. De même que plusieurs membres de la famille des hnRNPs, le BUB3 interagirait avec le PARP-1 (Saxena *et al.*, 2002).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Des expériences antérieures ont montré que la région -558 à -179 était responsable de la surexpression de l'apoD dans les cellules NIH/3T3 en arrêt de croissance par déprivation de sérum (Do Carmo *et al.*, 2002). Cette surexpression est aussi observable dans des tumeurs dites peu prolifératives et différenciées (López-Boado *et al.*, 1994; 1996; Hall *et al.*, 2004). Le but de cette étude était d'identifier les protéines nucléaires qui interagiraient directement avec le promoteur de l'apoD au niveau des éléments cis SRE1 et EBS et qui seraient impliquées dans cette induction. L'analyse des interactions entre ces éléments cis du promoteur et les protéines nucléaires a été effectuée par deux méthodes : la technique de retard sur gel et la purification de protéines avec les billes de streptavidine liées à l'oligo SRE1-EBS biotinylé.

4.1 Liaisons spécifiques au niveau du SRE1

L'utilisation de différentes méthodes d'extraction pouvant influencer le profil électrophorétique sur retard sur gel n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés. Les différences observées lors de l'optimisation de la technique peuvent être imputées au fait que la technique de retard sur gel est sensible à plusieurs facteurs. Ces facteurs peuvent inclure la concentration des cations monovalents dans la réaction de liaison de l'ADN avec les protéines, d'où l'importance d'une dialyse des extraits. Une trop forte concentration aurait un effet inhibiteur sur cette liaison. La qualité des extraits serait un autre facteur pouvant biaiser les résultats à plusieurs niveaux. Entre autre, les phosphatases ou exonucléases présentes dans les extraits bruts peuvent enlever les nucléotides radioactifs aux terminaisons des sondes d'oligos, générant des sondes non marquées et pouvant agir comme compétiteurs dans la

réaction de liaison. De plus, la concentration des ions Mg^{2+} , du BSA, du PolydIdC, le pourcentage de polyacrylamide du gel (entre 4 et 7%) ainsi que du ratio acrylamide : bis-acrylamide (généralement 29:1), l'épaisseur du gel (0,7-1,5 mm), la température de la réaction de liaison (de 0 °C à 37 °C), l'abondance du facteur d'intérêt dans les extraits et le tampon d'électrophorèse sont des facteurs, ainsi que plusieurs autres, qui peuvent influencer la formation de complexes et qui doivent être titrés pour chaque réaction de liaison effectuée avec de nouveaux extraits (Gabrielsen *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989; Lahiri et Ge, 2000; Roder et Scheizer, 2001).

Les résultats obtenus et présentés dans les Figures 3.3 à 3.5, montrent que la méthode d'extraction de protéines nucléaires est nécessaire pour étudier la liaison ADN-protéines. Notre étude a permis d'observer la formation de complexes spécifiques, tel que démontrés par les tests de compétition, tant en croissance qu'en arrêt de croissance (Fig. 3.5). De plus, il semble y avoir une régulation des complexes formés allant du cytoplasme vers le noyau et qui surviendrait lors de l'arrêt de croissance. Ce constat suppose qu'un facteur de transcription serait présent dans le cytoplasme des cellules en croissance, en attente d'un signal et irait vers le noyau pour lier le SRE1 suite à l'arrêt de croissance. La formation d'un complexe commun aux deux conditions cellulaires apparaît aussi sur retard sur gel (Fig. 3.5).

4.2 Purification des protéines nucléaires avec la séquence biotinylée SRE1-EBS couplée aux billes de streptavidine

Cette technique de purification des protéines nucléaires spécifiques au SRE1-EBS s'est avérée efficace. Des protéines liant spécifiquement cet oligo en condition de croissance et d'arrêt de croissance cellulaire ont été purifiées, de même que des protéines non-spécifiques liant les billes de streptavidine uniquement, utilisées comme contrôle tel qu'expliqué en détails à la section 4.5. Sachant l'importante implication du SRF dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes, par l'intermédiaire d'éléments cis dont le SRE et la boîte CArG, et de son interaction avec les membres de la famille des ETS, il serait tentant de supposer que ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans l'induction du

gène de l'apoD. Sachant le PM de ces deux protéines : 67 et 62 KDa, les bandes correspondant à ces PM ont été analysées (résultat non présenté). Toutefois, l'analyse de spectrométrie de masse de ces protéines de même que de celles liant le SRE-EBS, et répertoriées dans le Tableau II, ne révèle aucun facteur appartenant à ces deux familles. Cinq protéines furent identifiées : hnRNPs A/B (CBF-A) et U, PARP-1, Kif4 et BUB3.

4.3 Le PARP-1

Le PARP-1 est une protéine nucléaire de 116 KDa avec un domaine de liaison à l'ADN du côté N-terminal. Ce domaine est caractérisé par la présence de deux doigts de zinc et d'un signal de localisation nucléaire et joue un rôle crucial dans la reconnaissance des brisures à l'ADN (Rouleau *et al.*, 2004). Le PARP-1 est donc une protéine associée à la chromatine et capable de modifier plusieurs protéines nucléaires par ADP-ribosylation (Nordhoff *et al.*, 1999; Masutani *et al.*, 2003). Plusieurs études rapportent son implication dans la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire, la transformation tumorale, la réparation à l'ADN, et son clivage protéolytique est considéré comme un marqueur d'événements de l'apoptose (Tewari *et al.*, 1995). On rapporte aussi que son inhibition pourrait induire la différenciation cellulaire (Ohashi *et al.*, 1984) ce qui peut être corrélé avec l'implication de la surexpression de l'apoD dans les tumeurs différenciées. Par opposition, une surexpression du gène de PARP-1 est reliée à une instabilité génomique de carcinomes mammaires humains (Bièche *et al.*, 1996).

4.3.1 L'ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation a été décrite récemment comme ayant un rôle dans l'activation de facteurs de transcriptions qui se fait généralement par phosphorylation. Les résultats du Tableau II supportent cette hypothèse, montrant le PARP-1 uniquement en arrêt de croissance (bande 4), et il serait possible qu'une interaction protéine-protéine du PARP-1 avec les membres de la famille des hnRNPs identifiés et qu'une activation fonctionnelle s'opère suite à l'arrêt de croissance. La réaction de poly (ADP-ribosyl)ation est une modification unique et post-synthétique catalysée par les enzymes de la famille PARP en réponse à des agents

causant des dommages à l'ADN. En utilisant le NAD^+ comme substrat, les PARPs catalysent la formation de poly (ADP-ribose) (PADPr) allant jusqu'à 200 unités *in vitro* (Gagné *et al.*, 2003). L'existence de 5 isoformes est décrite dans la littérature (Saxena *et al.*, 2002; Amé *et al.*, 2004), dont le PARP-1 et 2 qui sont localisées dans le noyau et les isoformes 4 et 5 qui se retrouveraient dans le cytoplasme (Faraone-Mennella, 2005). Le PARP-3 se retrouverait aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (Rouleau *et al.*, 2004). Quoiqu'il en soit, la synthèse de PADPr prend place principalement dans le noyau des cellules. Finalement, plus de 30 substrats nucléaires des PARPs ont été identifiés (Wieler *et al.*, 2003).

4.3.2 Implication du PARP-1 dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire

Il existe une étroite relation entre le PARP-1 et la carcinogenèse (Masutani *et al.*, 2003). Le PARP-1 aurait un effet protecteur contre le développement du cancer en provoquant la mort de cellules par apoptose suite à un relargage de NAD^+ et d'ATP du noyau vers le cytoplasme. Ceci amènerait une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et le relargage de molécule d'AIF (pour « *Apoptose Inducing Factor* »). L'AIF irait ensuite se diriger vers le noyau pour lier l'ADN et le fragmenter, induisant ainsi la chromatinolyse indépendamment de la voie des caspases (Cande *et al.*, 2004).

Le PARP-1 serait aussi impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire par l'intermédiaire de p53 et de p21. Le PARP-1 se complexerait au facteur de transcription p53 qui serait ADP-ribosylé. Cette modification pourrait servir à moduler l'activité de liaison de p53 à des endroits spécifiques de l'ADN et aussi son activité de transcription de manière à favoriser l'arrêt de croissance cellulaire (Mendoza-Alvarez et Alvarez-Gonzalez, 2001; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2001; Wieler *et al.*, 2003). Il est aussi très bien connu que le PARP-1 peut s'auto ADP-ribosyler (Wieler *et al.*, 2003). D'autres études suggèrent que le PARP-1 serait essentiel dans le contrôle de la durée de l'arrêt de croissance induit par l'inhibiteur de l'ADN topoisomérase II, le C1305, dans les cellules fibroblastes murins (Wesierska-Gadek *et al.*, 2004).

4.3.3 PARP-1 : modulateur transcriptionnel

L'un des rôles inhabituels et récemment identifiés du PARP-1 est sa capacité de lier des éléments cis sur le promoteur de gènes et de moduler leur expression (Nordhoff *et al.*, 1999). Le PARP-1 peut modifier et former des complexes avec certains facteurs de transcription comme Oct-1, B-MYB, TEF-1, AP-1, p53 et NFκB. Il peut aussi inhiber l'initiation de transcription par poly (ADP-ribosyl)ation des protéines liant la boîte TATA, prévenant ainsi la formation de complexes d'initiation (Kraus et Lis, 2003). Des articles récents rapportent aussi que le PARP-1 peut agir positivement comme co-activateur dans la modulation de l'expression génique de l'E2F-1 durant l'entrée des cellules quiescentes dans la phase S du cycle cellulaire (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2001). Ces faits indiquent que le PARP-1 jouerait un rôle fondamental dans le recrutement de protéines cibles à des sites spécifiques et souvent indépendamment des bris dans l'ADN.

4.4 Les hnRNPs

Les protéines de hnRNPs de la famille des « *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* » sont parmi les plus abondantes des protéines nucléaires dans les cellules de mammifères (Patry *et al.*, 2003). Il existe plus de 20 isoformes, désignées hnRNP A jusqu'à hnRNP U, qui sont associées avec les ARNm précurseurs (pré-ARNm) et plusieurs influencent la maturation de ces pré-ARNm ainsi que leur transport (Dreyfuss *et al.*, 1993; Kajita *et al.*, 1995). Plus précisément, elles joueraient un rôle dans plusieurs événements comme l'épissage alternatif, la polyadénylation, le « *turnover* », l'exportation des ARNm hors du noyau et leur circulation cytoplasmique ainsi que leur stabilité et leur traduction (He *et al.*, 2005). Les particules 40S qui assemblent les ARN hétérogènes (ARNhn) sont composées en majeure partie par les protéines hnRNP A/B dont l'isoforme hnRNP A1 est la mieux caractérisée (Dreyfuss *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 2001; He *et al.*, 2005). Certaines de ces protéines (hnRNP A1, A2, D, E, I et K) circulent continuellement et rapidement entre le noyau et le cytoplasme (Inoue *et al.*, 2001). Les protéines hnRNPs participent aussi dans la régulation de l'expression de gènes. Ce rôle est rapporté dans la littérature entre autres pour les hnRNP A/B, D (aussi connu sous le nom de AUF1), K et U (Inoue *et al.*, 2001).

4.4.1 Rôles des hnRNPs

Ainsi, beaucoup d'intérêts sont apportés aux protéines hnRNP A/B et il est suggéré qu'elles seraient impliquées dans la prolifération cellulaire et le cancer (He *et al.*, 2005). Leur taux d'expression varie entre les cellules en prolifération et les cellules quiescentes, et une fluctuation est aussi observée à certains stades du cycle cellulaire. Ainsi, dans la phase G1 dans les cellules HeLa, les hnRNPs A2 et B1 sont synthétisés. Par contre, ces taux d'expression diminuent dans les phases G2 et M (Kamma *et al.*, 2001). Le niveau d'expression est particulièrement élevé dans certains tissus comme le cerveau, les testicules, les poumons, la rate et les ovaires (Kamma *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2002), qui expriment aussi l'apoD. De plus, en ce qui concerne l'isoforme A1, des taux d'expression modérément élevés ont été détectés dans les cancers du sein, de la prostate, des ovaires et du pancréas. Il en est de même pour l'isoforme A2 dont l'expression augmente dans les cellules fibroblastiques en prolifération (Biamonti *et al.*, 1993; He *et al.*, 2005). Ces résultats, bien documentés, suggèrent une corrélation entre la modulation de l'expression génique de l'apoD et la progression dans le cycle cellulaire. Un éventuel traitement thérapeutique pour plusieurs types de cancers pourrait être envisagé ayant pour cible ces protéines nucléaires (Patry *et al.*, 2003).

4.4.2 HnRNP A/B ou CBF-A

L'orthologue du hnRNP A/B humain chez la souris est le « *CAR-G-Box binding Factor A* » (CBF-A) identifié originellement pour sa capacité à lier la boîte CAR-G de plusieurs gènes (Mikheev *et al.*, 2000 ; Dean *et al.*, 2002). En effet, le CBF-A a été découvert en criblant une librairie d'expression avec un fragment d'ADN, contenant la boîte CAR-G, comme sonde. Par la suite, une activité répressive de la transcription lui a été attribuée (Kamada et Miwa, 1992). L'analyse des séquences en a.a. de plusieurs peptides tryptiques du CBF-A révèle qu'ils sont homologues aux membres appartenant à la même famille dont : le hnRNP A/B, le hnRNP C, le « *human single-stranded telomeric DNA-binding protein* » et le qTBP42 pour « *quadruplex telomere-binding protein 42* » (Sarig *et al.*, 1997). Il a aussi été montré que

deux séquences de peptides de 14 et 87 a.a. du qTBP42 étaient identiques aux séquences correspondantes du CBF-A. Par contre, le peptide de 14 a.a. n'a seulement que 28% d'homologie de séquence avec le hnRNP A/B et contiendrait 4 substitutions en a.a. pour le peptide de 87 a.a. (Sarig *et al.*, 1997). D'autres études proposent que le CBF-A soit renommé hnRNP D étant donné la similarité entre ces deux protéines (Dean *et al.*, 2002).

4.4.3 Le CBF-A et l'élément cis EBS

Mikheev et ses collègues (2000) ont montré que le CBF-A était capable de lier le EBS avec une plus grande affinité que la boîte CArG. Ceci suggère que le CBF-A ait été purifié, probablement, par l'intermédiaire du EBS contenu dans la séquence biotinylée SRE-EBS, quoique ces deux éléments cis ont probablement contribué, d'une manière synergique ou coopérative, à la purification de cette protéine. Une autre étude démontre aussi la capacité du CBF-A à interagir *in vivo* avec certaines protéines de la famille des ETS comme le PU.1 et l'elf-1 (Benmark *et al.*, 1998), suggérant un rôle potentiel du CBF-A dans la régulation des gènes dont le promoteur contient des éléments EBS. De plus, le CBF-A est surexprimé dans les cellules NIH/3T3 transformées avec les gènes de ETS-1 et 2, indiquant une probable coopération entre le CBF-A et certains membres de la famille des ETS (Mikheev *et al.*, 2000). Des tests de compétition ont permis de constater que le CBF-A aurait une plus grande affinité pour un autre élément cis, le HRE (« *Ha-ras response element* »), situé sur le promoteur du gène *Ha-ras* dans les cellules de glandes mammaires chez le rat, que pour la boîte CArG et le EBS (Mikheev *et al.*, 2000). L'élément HRE du gène *HA-ras* chez le rat a pour séquence : 3'-A CAG AGT TCG **CCG GAA** CCC CTA-5'. Les nucléotides mis en caractère gras indiquent clairement la séquence conservée du EBS (Mikheev *et al.*, 2000). Bien que le HRE soit connu pour interagir avec les protéines ETS, une technique de purification par chromatographie d'affinité utilisant la séquence d'ADN HRE comme matrice accrochait majoritairement le CBF-A (Mikheev *et al.*, 2000). De plus, cette étude démontre avec des tests de transfection que le CBF-A serait un activateur transcriptionnel du gène *Ha-ras*, contrairement à son rôle répressif initialement décrit (Kamada et Miwa, 1992; Mikheev *et al.*, 2000).

4.4.4 Le CBF-A et la boîte CArG

La boîte CArG est capable d'interagir avec plusieurs facteurs de transcription autres que le CBF-A. Parmi ces facteurs de transcription, on retrouve Elk-1 et SAP-1 de la famille des ETS (Dalton et Treisman, 1992), les protéines de la famille des HMG-I (Chin *et al.*, 1998), le facteur E12 et NF-IL-6 (Metz et Ziff, 1991) et le SRF de la famille des « *MADs box* » et son antagoniste, la protéine YY1 (Gualberto *et al.*, 1992). Il est fort possible que le CBF-A puisse remplacer ces candidats dépendamment du promoteur des gènes contenant une boîte CArG de même que du type cellulaire.

4.4.5 Le hnRNP U

Le hnRNP U est aussi activement impliqué dans les processus de gestion des pré-ARNm. Tout comme pour le CBF-A, un rôle de facteur de transcription lui a été attribué suite à l'analyse de plusieurs gènes, particulièrement dans le cas du gène de l'ostéopontine (OPN) où le hnRNP U agirait comme activateur transcriptionnel (Gao *et al.*, 2005). De même que pour le gène « *Kruppel-like factor 2* » (KLF2), le hnRNP U interagirait directement avec son promoteur *in vivo* et aurait un effet activateur alors que le CBF-A serait un répresseur constitutif pour ce gène (Ahmad et Lingrel, 2005). Dans l'étude de la régulation du gène de l'OPN, Gao et ses collègues (2005) ont démontré que, dans les cellules de macrophages murins RAW 264.7 et dans les cellules COS-1, le CBF-A et le hnRNP U auraient des fonctions régulatrices de la transcription du gène de l'OPN. En fait, ils agiraient en antagonistes dans l'expression de ce gène induit indirectement par le lipopolysaccharide (LPS). Ainsi, en présence de LPS, le CBF-A se dissocierait du promoteur et subséquemment le hnRNP U viendrait le lier. L'expression réprimée du gène de l'OPN par le CBF-A serait subséquemment induite par la liaison du hnRNP U au promoteur (Gao *et al.*, 2005). Ces résultats concorderaient solidement avec ceux obtenus au cours de ce projet. Assurément, le hnRNP U a été purifié et identifié uniquement à partir d'extraits nucléaires provenant de cellules en arrêt de croissance avec le score le plus élevé de 244 et 5 peptides tryptiques confirmant son identité (bande 4 du Tableau II). Comme mentionné précédemment, le PARP-

Il pourrait activer le hnRNP U lors de l'arrêt de croissance, par ADP-ribosylation. Certes, seules les protéines hnRNP A2/B1, C1/C2, E1, G, H, K et M ont été décrites dans la littérature comme étant ADP-ribosylés par le PARP-1 (Gagné *et al.*, 2003). Des tests de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps couplés à des billes d'agarose et dirigés contre PARP-1 ou hnRNP U permettront de confirmer l'interaction de ces deux protéines impliquées dans l'arrêt de croissance. Un immunobuvardage de hnRNP U purifié et extrait à partir de cellules en croissance et en arrêt de croissance permettra de vérifier pour la première fois l'ADP-ribosylation du hnRNP U par le PARP-1. Des anticorps dirigés contre le pADPr seront utilisés. Le CBF-A présent dans les deux conditions auraient probablement une fonction répressive et constitutive.

4.5 Interaction de Kif4 et de PARP-1

Le Kif4 fait partie de la famille des kinésines. Les kinésines sont des protéines associées aux microtubules et spécialisées dans le transport d'organelles membranaires, de complexes de protéines et d'ARNms (Hirokawa, 1998 ; Hirokawa et Takemura, 2005 ; Midorikawa *et al.*, 2006). Le Kif4 est fortement exprimé dans les tissus juvéniles comme les neurones différenciés et se retrouve principalement dans le noyau et aux extrémités des dendrites en expansion (Aizawa *et al.*, 1992 ; Sekine *et al.*, 1994). D'autres homologues du Kif4 furent identifiés comme le Chromokinésine chez le poulet, le XKLP1 chez le *Xénopus* et le hKif4A chez l'humain. Ces homologues sont plutôt impliqués dans la ségrégation des chromosomes durant la mitose (Vernos *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 2001). Toutefois, Midorikawa et ses collègues (2006) ont montré que le domaine C-terminal du Kif4 réprimerait l'activité enzymatique de PARP-1. Des tests de co-immunoprécipitation ont confirmé l'interaction entre ces deux protéines. De plus, des tests de transfection avec différentes constructions de vecteurs exprimant la partie C-terminale ou la protéine complète de Kif4 montrent qu'elles interagissent avec PARP-1 endogène dans le noyau de cellules NIH/3T3 en condition normale de culture. La partie N-terminale n'interagirait pas avec PARP-1. Ces résultats suggèrent que la localisation nucléaire de Kif4 serait modulé par sa liaison avec PARP-1. Par la suite, cette même équipe a montré que PARP-1 était phosphorylé par la calmoduline kinase

II (CaMkII) suite à une dépolarisation membranaire. Cette phosphorylation permettrait l'auto-ADP-ribosylation de PARP-1 qui inhiberait sa liaison avec Kif4 (Midorikawa *et al.*, 2006). Considérant ces faits, il est possible que l'expression du gène de l'apoD soit sous le contrôle de l'interaction entre Kif4 et PARP-1. Finalement, l'interaction de Kif5, un autre membre de la famille des kinésines, avec le hnRNP U est aussi rapportée dans la littérature (Kanai *et al.*, 2004). Cette étude mentionne que ces deux protéines feraient partie d'un complexe impliqué dans le transport des ARNms.

4.6 Interaction de BUB3 et de PARP-1

Lors de la division cellulaire, les organismes eucaryotes ont développé un mécanisme permettant d'arrêter le cycle cellulaire à des étapes spécifiques suite à un dysfonctionnement durant la mitose (Skibbens et Hieter, 1998 ; Amon, 1999 ; Baek *et al.*, 2002). Ce mécanisme, géré par des points de contrôle mitotique, est effectué essentiellement par des composants protéiques qui sont le BUB1, 2 et 3, le MAD1 (« mitotic arrest defective ») 2 et 3 (Baek *et al.*, 2002), le Mps1 et le Cenpe (Taylor *et al.*, 1997 ; Waters *et al.*, 1998 ; Chan *et al.*, 1999 ; Abrieu *et al.*, 2000 ; Yoon *et al.*, 2004). Ces composants du point de contrôle mitotique assurent aussi la bonne ségrégation des chromosomes répliqués qui sont souvent altérés dans les cellules cancéreuses (Cahill *et al.*, 1998 ; Hardwick, 1998 ; Baek *et al.*, 2002).

Le BUB3 contient 4 domaines répétés et hautement conservés qui se terminent avec les a.a. tryptophane (Trp-W) et acide aspartatique (Asp-D). Dans la littérature, ces domaines sont souvent nommés « WD repeats » et sont retrouvés dans plusieurs protéines. Ces domaines seraient impliqués dans les interactions protéines-protéines (Neer *et al.*, 1994 ; Baek *et al.*, 2002) et réguleraient diverses fonctions cellulaires incluant le remodelage de la chromatine, la maturation des ARNs, la division cellulaire et la transcription de gènes (Yoon *et al.*, 2004). Effectivement, plusieurs protéines ayant ces motifs répétitifs WD interagissent avec des histones déacétylases (HDAC) et ont un rôle à jouer dans la répression transcriptionnelle. Cette activité répressive régulerait l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Ahmad *et al.*, 1999 ; Mitsuzawa *et al.*, 2001 ; Yoon *et al.*, 2004). Yoon et ses

collègues (2004) ont démontré que le BUB3 et le cdc20 qui est une protéine activatrice du cycle cellulaire, interagissent avec HDAC1 et 2. Ces interactions induiraient l'arrêt du cycle cellulaire et auraient une activité répressive dans la transcription.

Finalement, des études effectuées par Saxena et ses collègues (2002) montrent, par immunoprécipitation et immunobuvardage, que PARP-1 interagit avec BUB3 et aussi avec des protéines du centromère, Cenpa et Cenpc. Ces protéines seraient aussi poly (ADP) ribosylées suite à un dommage à l'ADN génomique. Il est connu que la poly (ADP) ribosylation des protéines par PARP-1 est une modification post-traductionnelle impliquée dans l'apoptose, la réparation de l'ADN, la modulation de la structure de la chromatine et la transcription de gènes (D'Amours *et al.*, 1999 ; Burkle, 2001 ; Saxena *et al.*, 2002). Ainsi, ces découvertes mettent en valeur les résultats obtenus au cours de ce projet. Le BUB3 a été purifié en condition de croissance et d'arrêt de croissance alors que le PARP-1 serait lié au SRE1-EBS uniquement en arrêt de croissance, indiquant une possible coopération entre ces deux protéines.

4.7 Analyse des protéines non-spécifiques

Toutes les protéines non-spécifiques identifiées dans le contrôle (bandes 3 et 6 de la Figure 3.6) et se retrouvant aussi dans la liste des extraits nucléaires (bandes 1; 2 et 5) ont été ignorées. À part les cinq protéines discutées dans ce chapitre, plusieurs autres ont été identifiées mais leur implication dans la régulation génique et/ou dans la prolifération cellulaire n'est pas rapportée dans la littérature. Par contre, une étude plus poussée de ces protéines serait nécessaire afin de confirmer ou non leur implication dans l'induction de l'apoD lors de l'arrêt de croissance cellulaire.

Dans le cas de l'AIF (bande 8), il est connu pour son rôle dans l'apoptose et son implication dans la voie de signalisation du PARP-1. Il y a aussi le Hsp70 (bande 7) qui fait partie de la famille des « *heat shock protein* » et dont certains membres comme le Hsp90 sont connus pour moduler la liaison du récepteur de l'œstrogène à l'ADN et aussi pour son

interaction avec le facteur de transcription ERG. Cette interaction modulerait la liaison d'ERG avec les éléments ETS par activation ou phosphorylation (Deramaudt *et al.*, 2001). Le « *glucose-regulated protein* » (GRP-78 ; bande 7) de 78 KDa a également été co-purifié avec les protéines hnRNP D et U, le CBF-A, le facteur associé au P300/CBP (PCAF), le « *cAMP response element binding protein* » (CREB) et le SWI-SNF (Ahmad et Lingrel, 2005). Cette purification a été réalisée par chromatographie d'affinité en utilisant une séquence du promoteur du gène KLF2. Ces résultats permettent de considérer qu'une séparation des protéines éluées sur SDS-PAGE 2D aurait pu minimiser le nombre de protéines non-spécifiques co-migrant avec celles spécifiques, sachant qu'il est préférable d'obtenir une seule protéine par bande lors du séquençage.

Finalement, ces résultats suggèrent que les protéines hnRNPs pourraient avoir une double fonction dans les cellules, c'est-à-dire être impliquées autant dans les processus des ARN, comme l'épissage alternatif et leur transport, que dans le contrôle transcriptionnel des gènes. Il est possible de spéculer que ces protéines jouent un rôle structural en distordant l'ADN, c'est-à-dire en le courbant et facilitant efficacement l'activation transcriptionnelle, alors que le PARP-1 émergerait aussi comme une composante des complexes régulateurs des promoteurs essentiels à la régulation des gènes.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

L'induction génique de l'apoD dans les cellules fibroblastes murines NIH/3T3 en arrêt de croissance par la déprivation de sérum serait modulée par des protéines nucléaires formant des complexes spécifiques sur les éléments cis SRE1-EBS, situés sur le promoteur du gène de l'apoD. Ces protéines sont identifiées comme étant: le PARP-1, le hnRNP A/B ou CBF-A, le hnRNP U, le Kif4 et le BUB3. L'identité de plusieurs autres reste à confirmer. Durant cette dernière décennie, beaucoup d'informations sont publiées sur le rôle inhabituel de ces protéines dans la régulation de l'expression génique. Eu égard à ces faits, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation impliquées, notamment au niveau nucléaire et un tant soit peu au niveau cytoplasmique, afin d'élucider les mécanismes régissant cette induction d'expression génique.

À *priori*, la vérification de l'identité de ces protéines par retard sur gel à l'aide d'anticorps (technique de « *supershift* ») et des tests d'immunocytochimie viendraient confirmer respectivement la spécificité de liaison de ces protéines au promoteur de l'apoD, de même que l'hypothèse de leur transfert du cytoplasme au noyau lors de l'arrêt de croissance. De plus, connaissant l'importante implication du SRE dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes, les niveaux d'expression et de traduction de ces protéines devrait être analysés en arrêt de croissance par RT-PCR et immunobuvardage. Cette analyse permettra de voir si ces protéines sont modulées aussi dans l'arrêt de croissance et indubitablement d'une façon précoce. Bien que ces protéines lient le promoteur de l'apoD *in vitro*, les conditions peuvent être différentes *in vivo*. Une immuno-précipitation de la chromatine (ChiP), suivie d'une amplification par PCR permettrait de confirmer l'interaction de ces protéines, *in vivo*,

avec le promoteur de l'apoD. Finalement, l'implication de ces protéines dans la régulation positive ou répressive du gène de l'apoD peut être investiguée par des expériences de transfection. Effectivement, les ADNc de ces protéines, ainsi que de certaines de leur isoformes, ont déjà été clonés. Ces clones seraient co-transfectés avec une construction contenant le promoteur du gène de l'apoD et un gène rapporteur, la luciférase. Une activation du gène de la luciférase confirmerait l'implication de ces protéines nucléaires dans l'induction de l'apoD lors de l'arrêt de croissance.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrieu A, Kahana JA, Wood KW, Cleveland DW. 2000. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell*. 102(6):817-26.
- Ahmad A, Takami Y, Nakayama T. 1999. WD repeats of the p48 subunit of chicken chromatin assembly factor-1 required for in vitro interaction with chicken histone deacetylase-2. *J Biol Chem*. 1999 Jun 4;274(23):16646-53.
- Ahmad N, Lingrel JB. 2005. Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases. *Biochemistry*. 44(16):6276-85.
- Aizawa H, Sekine Y, Takemura R, Zhang Z, Nangaku M, Hirokawa N. 1992. Kinesin family in murine central nervous system. *J Cell Biol*. 119(5):1287-96.
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. 2004. The PARP superfamily. *Bioessays*. (8):882-93.
- Amon A. 1999. The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev*. 1999 (1):69-75.
- Aspinall JO, Bentel JM, Horsfall DJ, Haagensen DE, Marshall VR, Tilley WD. 1995. Differential expression of apolipoprotein-D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J Urol*. 154(2 Pt 1):622-8.
- Atadja PW, Stringer KF, Riabowol KT. 1994. Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging. *Mol Cell Biol*. 14(7):4991-9.
- Ayrault-Jarrier M, L'Evy G, Polonovski J. 1963. Étude des Alpha-apolipoprotéines sériques humaines par immunoélectrophorèse. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*. 45:703-13.
- Baek WK, Park JW, Lim JH, Suh SI, Suh MH, Gabrielson E, Kwon TK. 2002. Molecular cloning and characterization of the human budding uninhibited by benomyl (BUB3) promoter. *Gene*. 295(1):117-23.
- Balbin, M., Freije, J.M., Fueyo, A., Sanchez, L.M., Lopez-Otin, C. 1990. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem. J*. 271(3): 803-807.

- Bemark M, Olsson H, Heinegård D, Leanderson T. 1998. Purification and characterization of a protein binding to the SP6 kappa promoter. A potential role for CArG-box binding factor-A in kappa transcription. *J Biol Chem* 273: 18881–18890
- Biamonti, G., M. T. Bassi, L. Cartegni, F. Mechta, M. Buvoli, F. Cobianchi, and S. Riva. 1993. Human hnRNP protein A1 gene expression. Structural and functional characterization of the promoter. *J. Mol. Biol.* 230:77-89.
- Biéche I, de Murcia G, Lidereau R. 1996. Poly(ADP-ribose) polymerase gene expression status and genomic instability in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2(7):1163-7.
- Boyles, J.K., Notterpek, L.M., Anderson, L.J. 1990. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 265(29): 17805-17815.
- Brivanlou AH, Darnell JE Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science.* 295(5556):813-8.
- Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B. 2004. Ets ternary complex transcription factors. *Gene.* 324:1-14.
- Burkle A. 2000. Poly(ADP-ribosyl)ation: a posttranslational protein modification linked with genome protection and mammalian longevity. *Biogerontology.* 1(1):41-6.
- Buscarlet M. 2003. Étude de la régulation de l'expression de l'apolipoprotéine D en situation de stress neurologique. Mémoire. UQAM.
- Cahill DP, da Costa LT, Carson-Walter EB, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. 1999. Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics.* 58(2):181-7.
- Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. 2004. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 11(6):591-5.
- Chai J, Baatar D, Moon W, Tarnawski A. 2002. Expression of serum response factor in normal rat gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol.* 53(2):289-94.
- Chai J, Tarnawski AS. 2002. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol.* 53(2):147-57.
- Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC, Yen TJ. 1999. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the

- cyclosome/APC. *J Cell Biol.* 146(5):941-54.
- Chin MT, Pellacani A, Wang H, Lin SS, Jain MK, Perrella MA, Lee ME. 1998. Enhancement of serum-response factor-dependent transcription and DNA binding by the architectural transcription factor HMG-I(Y). *J Biol Chem.* 273(16):9755-60.
- Cofer S, Ross SR. 1996. The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene.* 171(2):261-3.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. 1999. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 342 (Pt 2):249-68.
- Dalton S, Treisman R. 1992. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell.* 68(3):597-612.
- Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Deslys JP, Lasmezas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M. 1998. Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem.* 273(13):7691-7.
- Dean JL, Sully G, Wait R, Rawlinson L, Clark AR, Saklatvala J. 2002. Identification of a novel AU-rich-element-binding protein which is related to AUF1. *Biochem J.* Sep 15;366(Pt 3):709-19.
- del Valle E, Navarro A, Astudillo A, Tolivia J. 2003. Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J Histochem Cytochem.* 51(10):1285-90.
- Deramaudt TB, Remy P, Stiegler P. 2001. Identification of interaction partners for two closely-related members of the ETS protein family, FLI and ERG. *Gene.* 274(1-2):169-77.
- Diez-Itza I, Vizoso F, Merino AM, Sanchez LM, Tolivia J, Fernandez J, Ruibal A, Lopez-Otin C. 1994. Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol.* 144(2):310-20.
- Diggnam, J.D., Lebovitz, R.M. et Roeder, R.G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymérase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11 :1475-1489.
- Dilley, W.G., Haagenzen, D.E., Cox, C.E., Wells, S.A.Jr. 1990. Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein Isolated from Human Breast Gross Cystic Disease Fluid. *Breast Cancer Res. Treat.* 16: 253-260.
- Do Carmo S, Seguin D, Milne R, Rassart E. 2002. Modulation of apolipoprotein D and

- apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem.* 277(7):5514-23. Epub.
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K., Lawn, R. 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* 261: 16535-16539.
- Drayna, D.T., McLean, J.W., Wion, K.L., Trent, J.M., Drabkin, H.A. et Lawn, R.M. 1987. Human Apolipoprotein D Gene : Gene Sequence, Chromosome Localization, and homology to the $\alpha\mu$ -Globuline Superfamily. *DNA* 6 : 199-204.
- Drewett V, Devitt A, Saxton J, Portman N, Greaney P, Cheong NE, Alnemri TF, Alnemri E, Shaw PE. 2001. Serum response factor cleavage by caspases 3 and 7 linked to apoptosis in human BJAB cells. *J Biol Chem.* 276(36):33444-51. Epub.
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 62:289-321.
- Escribano J, Ortego J, Coca-Prados M. 1995. Isolation and characterization of cell-specific cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human donor: transcription and synthesis of plasma proteins. *J Biochem (Tokyo).* 118(5):921-31.
- Faraone-Mennella MR. 2005. Chromatin architecture and functions: the role(s) of poly(ADP-RIBOSE) polymerase and poly(ADPribosyl)ation of nuclear proteins. *Biochem Cell Biol.* 83(3):396-404.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1): 6-13.
- Fisher RJ, Mavrothalassitis G, Kondoh A, Papas TS. 1991. High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene.* 6(12):2249-54.
- Franz G, Reindl M, Patel SC, Beer R, Unterrichtre I, Berger T, Schmutzard E, Poewe W, et Kampfl A. 1999. Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 73: 1915-1625.
- Gabrielsen OS, Marzouki N, Ruet A, Sentenac A, Fromageot P. 1989. Two polypeptide chains in yeast transcription factor tau interact with DNA. *J Biol Chem.* 264(13):7505-11.
- Gagné JP, Hunter JM, Labrecque B, Chabot B, Poirier GG. 2003. A proteomic approach to

the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem J.* 371(Pt 2):331-40.

Gao C, Guo H, Mi Z, Wai PY, Kuo PC. 2005. Transcriptional regulatory functions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-U and -A/B in endotoxin-mediated macrophage expression of osteopontin. *J Immunol.* 175(1):523-30.

Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE. 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* 14(5):951-62.

Gilmour RS, Spandidos DA, Vass JK, Gow JW, Paul J. 1984. A negative regulatory sequence near the mouse beta-maj globin gene associated with a region of potential Z-DNA. *EMBO J.* 3(6):1263-72.

Glöckner F, Ohm TG. 2003. Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype. *Neuroscience.* 122(1):103-10.

Gualberto A, LePage D, Pons G, Mader SL, Park K, Atchison ML, Walsh K. 1992. Functional antagonism between YY1 and the serum response factor. *Mol Cell Biol.* 12(9):4209-14.

Hahn SL, Wasylyk B. 1994. The oncoprotein v-Ets is less selective in DNA binding than c-Ets-1 due to the C-terminal sequence change. *Oncogene.* 9(9):2499-512.

Hall RE, Horsfall DJ, Stahl J, Vivekanandan S, Ricciardelli C, Stapleton AM, Scardino PT, Neufing P, Tilley WD. 2004. Apolipoprotein-D: a novel cellular marker for HGPIN and prostate cancer. *Prostate.* 58(2):103-8.

Hamada H, Seidman M, Howard BH, Gorman CM. 1984. Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence. *Mol Cell Biol.* 4(12):2622-30.

Hardwick KG. 1998. The spindle checkpoint. *Trends Genet.* 14(1):1-4.

He Y, Brown MA, Rothnagel JA, Saunders NA, Smith R. 2005. Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *Cell Sci.* 118(Pt 14):3173-83.

Hirokawa N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):519-26.

Hirokawa N, Takemura R. 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci.* 6(3):201-14.

Holzfeind P, Merschak P, Dieplinger H, Redl B. 1995. The human lacrimal gland synthesizes

- apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily. *Exp Eye Res.* 61(4):495-500.
- Hu, C.Y., Ong, W.Y., Sundaram, R.K., Chan, C., Patel, S.C. 2001. Immunocytochemical localization of apolipoprotein D in oligodendrocyte precursor-like cells, perivascular cells, and pericytes in the human cerebral cortex. *J. Neurocytol.* 30: 209-218.
- Hunter S, Young A, Olson J, Brat DJ, Bowers G, Wilcox JN, Jaye D, Mendrinos S, et Neish A, 2002. Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas : identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 275-281.
- Hunter SB et Moreno CS. 2002. Expression microarray analysis of brain tumors : what have we learned so far. *Front Biosci* 7: c74-82.
- Inoue, A., Omori, A., Ichinose, S., Takahashi, K. P., Kinoshita, Y. and Mita, S. 2001. S1 proteins C2 and D2 are novel hnRNPs similar to the transcriptional repressor, CArG box motif-binding factor A. *Eur. J. Biochem.* 268, 3654-3663.
- Johnson-Wood K, lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R, Khan K, Gordon M, Tan H, Games D, Lieberburg I, Schenk D, Seubert P, et McConlogue L. 1997. Amyloid precursor protein processing and Ab42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1550-1555.
- Kajita Y, Nakayama J, Aizawa M, Ishikawa F. 1995. The UUAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0. Common modular structure and binding properties of the 2xRBD-Gly family. *J Biol Chem.* 270(38):22167-75.
- Kamada, S. and Miwa, T. 1992. A protein binding to CArG box motifs and to single-stranded DNA functions as a transcriptional repressor. *Gene* 119, 229-236
- Kamma H, Horiguchi H, Wan L, Matsui M, Fujiwara M, Fujimoto M, Yazawa T, Dreyfuss G. 1999. Molecular characterization of the hnRNP A2/B1 proteins: tissue-specific expression and novel isoforms. *Exp Cell Res.* 246(2):399-411.
- Kamma H, Satoh H, Matsui M, Wu WW, Fujiwara M, Horiguchi H. 2001. Characterization of hnRNP A2 and B1 using monoclonal antibodies: intracellular distribution and metabolism through cell cycle. *Immunol Lett.* 76(1):49-54
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron.* 43(4):513-25.
- Kathleen SM, Lawn RM, Wilcox JN. 1990. Cellular localization of apolipoprotein D and

- lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res.* 31(6):995-1004.
- Kiledjian M, Dreyfuss G. 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J.* 11(7):2655-64.
- Kraus WL, Lis JT. 2003. PARP goes transcription. *Cell.* 113(6):677-83.
- Lahiri DK, Ge Y. 2000. Electrophoretic mobility shift assay for the detection of specific DNA-protein complex in nuclear extracts from the cultured cells and frozen autopsy human brain tissue. *Brain Res Brain Res Protoc.* 5(3):257-65.
- Latinkic BV, Zeremski M, Lau LF. 1996. Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic Acids Res.* 1;24(7):1345-51.
- Lee YM, Lee S, Lee E, Shin H, Hahn H, Choi W, Kim W. 2001. Human kinesin superfamily member 4 is dominantly localized in the nuclear matrix and is associated with chromosomes during mitosis. *Biochem J.* 360(Pt 3):549-56.
- Lea OA. 1988. Binding properties of progesterone-binding Cyst protein, PBCP. *Steroids.* 52(4):337-8
- Lopez-Boado YS, Klaus M, Dawson MI, et Lopez-Otin C, 1996. Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RAR-dependent signalling pathway. *J Biol Chem* 271: 32105-32111.
- Lopez-Boado Ys, Tolivia J, et Lopez-Otin C, 1994. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:26871-26878.
- Ma AS, Moran-Jones K, Shan J, Munro TP, Snee MJ, Hoek KS, Smith R. 2002. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *J Biol Chem.* 277(20):18010-20.
- Maslah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, et Games D, 1996. Comparaison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein Alzaheimer's disease. *J Neurosci* 16:5795-5811.
- Masutani M, Nakagama H, Sugimura T. 2003. Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 38(4):339-48.
- McConathy, W.J., Alaupovic, P. 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein

- D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* 37(2): 178-182.
- Metz R, Ziff E. 1991. The helix-loop-helix protein rE12 and the C/EBP-related factor rNFIL-6 bind to neighboring sites within the c-fos serum response element. *Oncogene.* (12):2165-78.
- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R. 2001. Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosylation). *J Biol Chem.* 276(39):36425-30.
- Miano JM. 2003. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 35(6):577-93.
- Midorikawa R, Takei Y, Hirokawa N. 2006. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell.* 125(2):371-83.
- Mikheev AM, Mikheev SA, Zhang Y, Aebersold R, Zarbl H. 2000. CARG binding factor A (CBF-A) is involved in transcriptional regulation of the Ha-ras promoter. *Nucl Acid Res* 28: 3762-3770.
- Mitsuzawa H, Seino H, Yamao F, Ishihama A. 2001. Two WD repeat-containing TATA-binding protein-associated factors in fission yeast that suppress defects in the anaphase-promoting complex. *J Biol Chem.* 276(20):17117-24.
- Morais Cabral JH, Atkins GL, Sanchez LM, Lopez-Boado YS, Lopez-Otin C, Sawyer L. 1995. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett.* 366(1):53-6.
- Navarro A, Del Valle E, Tolivia J. 2004. Differential expression of apolipoprotein d in human astroglial and oligodendroglial cells. *Histochem Cytochem.* 52(8):1031-6.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* 371(6495):297-300.
- Nordhoff E, Krogsdam AM, Jorgensen HF, Kallipolitis BH, Clark BF, Roepstorff P, Kristiansen K. 1999. Rapid identification of DNA-binding proteins by mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 17(9):884-8.
- Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD, Graves BJ. 1992. Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* 6(6):975-90.
- O'Brien et Sampson. 1965. Myelin Membrane: a molecular abnormality. *Science.* 150(703):1613-4.

- Ohashi Y, Ueda K, Hayaishi O, Ikai K, Niwa O. 1984. Induction of murine teratocarcinoma cell differentiation by suppression of poly(ADP-ribose) synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov;81(22):7132-6.
- Ong WY, He Y, Suresh S, Patel SC. 1997. Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience*. 79(2):359-67.
- Ong WY, Lau CP, Leong SK, Kumar U, Suresh S, Patel SC. 1999. Apolipoprotein D gene expression in the rat brain and light and electron microscopic immunocytochemistry of apolipoprotein D expression in the cerebellum of neonatal, immature and adult rats. *Neuroscience*. 90(3):913-22.
- Pancetti F, Bosser R, Krehan A, Pyerin W, Itarte E, Bachs O. 1999. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 interacts with protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun*. 260(1):17-22.
- Patel SC, Pentchev PG. 1989. Genetic defects of lysosomal function in animals. *Annu Rev Nutr*;9:395-416.
- Patel SC, Asotra K, Patel YC, McConathy WJ, Patel RC, et Suresh S, 1995. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport* 6: 653-657.
- Patry C, Bouchard L, Labrecque P, Gendron D, Lemieux B, Toutant J, Lapointe E, Wellinger R, Chabot B. 2003. Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Res*. 63(22):7679-88.
- Pearlman WH, Gueriguian JL, Sawyer ME. 1973. A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J Biol Chem*. 248(16):5736-41.
- Peitsch, M.C., Boguski, M.S. 1990. Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol*. 2(2): 197-206.
- Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ, Dawidowicz EA. 1994. The NP-C gene: a key to pathways of intracellular cholesterol transport. *Trends Cell Biol*. 4(10):365-9.
- Provost, P.R., Weech, P.K., Tremblay, N.M., Marcel, Y.L. et Rassart, E. 1990. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipids Res*. 31 :2057-2065.

- Provost PR, Marcel YL, Milne RW, Weech PK, Rassart E. 1991. Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett.* 290(1-2):139-41.
- Ramirez S, Ait-Si-Ali S, Robin P, Trouche D, Harel-Bellan A. 1997. The CREB-binding protein (CBP) cooperates with the serum response factor for transactivation of the c-fos serum response element. *J Biol Chem.* 272(49):31016-21.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L, Milne R. 2000. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta.* 1482(1-2): 185-198.
- Rech J, Barlat I, Veyrune JL, Vie A, Blanchard JM. 1994. Nuclear import of serum response factor (SRF) requires a short amino-terminal nuclear localization sequence and is independent of the casein kinase II phosphorylation site. *J Cell Sci.* (Pt 11):3029-36.
- Reindl M, Knipping G, Wicher I, Dilitz E, Egg R, Deisenhammer F, Berger T. 2001. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 119(2):327-32.
- Roder K, Schweizer M. 2001. Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA). *Biotechnol Appl Biochem.* 33(Pt 3):209-14.
- Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. 2004. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci.* 117(Pt 6):815-25.
- Salier JP. 1999. Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes. *Biochim Biophys Acta.* 1482(1-2):25-34.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Sambrook, J. et Russell D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual.* 3rd Edition; vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Sanchez LM, Vizoso F, Diez-Itza I, Lopez-Otin C. 1992a. Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res.* 52(1):95-100.
- Sanchez LM, Diez-Itza I, Vizoso F, et Lopez-Otin C, 1992b. Cholesterol and apolipoprotein D in gross cystic disease of the breast. *Clin Chem* 38: 695-698.

- Sarig G, Weisman-Shomer P, Fry M. 1997. Telomeric and tetraplex DNA binding properties of qTBP42: a homologue of the CA/G box binding protein CBF-A. *Biochem Biophys Res Commun.* 237(3):617-23.
- Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P, Choo KH. 2002. Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem.* 277(30):26921-6.
- Schindler PA, Settineri CA, Collet X, Fielding CJ, Burlingame AL. 1995. Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Sci.* 4(4):791-803.
- Seguin D, Desforges M, Rassart E. 1995. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res.* 30(2):242-50.
- Sekine Y, Okada Y, Noda Y, Kondo S, Aizawa H, Takemura R, Hirokawa N. 1994. A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *J Cell Biol.* 127(1):187-201.
- Sharrocks AD. 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(11):827-37.
- Simard J, Dauvois S, Haagensen DE, Levesque C, Merand Y, et Labrie F, 1990. Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology* 126: 3223-3231.
- Simard J, Veilleux R, de Launoit Y, Haagensen DE et Labrie F, 1991. Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCap prostate cancer cells. *Cancer Res* 51: 4336-4341.
- Simard J, de Launoit Y, Haagensen DE, 1992. Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* 130: 1115-1121. 27.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo RB, Samara R, Jung M, Dritschilo A, Spoonde A, Smulson ME. 2001. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 in vitro and in vivo modulates binding to its DNA consensus sequence. *Neoplasia.* 3(3):179-88.

- Skibbens RV, Hieter P. 1998. Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery. *Annu Rev Genet.* 32:307-37
- Spreyer P, Schaal H, Kuhn G, Rothe T, Unterbeck A, Olek K, Muller HW. 1990. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* 9(8):2479-84.
- Steyrer, E., Kostner, G.M. 1988. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochem Biophys Acta.* 958(3): 484-491.
- Suresh, S., Yan, Z., Patel, R.C., Patel, Y.C., Patel, S.C. 1998. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem.* 70(1): 242-51.
- Taylor SS, McKeon F. 1997. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell.* 89(5):727-35.
- Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Milne, R., Rassart, E. 1998. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem.* 71(4): 1643-50.
- Terrisse L, Seguin D, Bertrand P, Poirier J, Milne R, Rassart E. 1999. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res Mol Brain Res.* 70(1):26-35.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 81(5):801-9.
- Thomas, E.A., Dean, B., Pavey, G., Sutcliffe, J.G. 2001a. Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(7): 4066-4071.
- Treisman R. 1986. Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell.* 15;46(4):567-74.
- Treisman R. 1990. The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin Cancer Biol.* 1(1):47-58.
- Treisman R. 1992. Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *EMBO J.* 11(12):4631-40.

- Vernos I, Raats J, Hirano T, Heasman J, Karsenti E, Wylie C. 1995. Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell*. 81(1):117-27.
- Voet D. et Voet J. G. 1998. Biochimie. DeBoeck Université, 2ieme Édition, pp. 1038-1039; 1275-1284
- Vogt M, Skerra A. 2004. Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem*.5(2):191-9.
- Von Euler US, 1988. Prostaglandins, biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Curtis-Prior, PB Ed., Churchill-Livingstone: 1-7.
- Warden, C.H., Diep, A., Taylor, B.A. et Lusir, A.J. 1992. Localization of the gene for apolipoprotein D on mouse chromosome 6. *Genomics* 12 :851-852.
- Waters JC, Chen RH, Murray AW, Salmon ED. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol*. 141(5):1181-91.
- Weisman-Shomer P, Cohen E, Fry M. 2002. Distinct domains in the CArG-box binding factor A destabilize tetraplex forms of the fragile X expanded sequence d(CGG)n. *Nucleic Acids Res*. 30(17):3672-81.
- Wesierska-Gadek J, Schloffer D, Gueorguieva M, Uhl M, Skladanowski A. 2004. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout cells to antitumor triazoloacridone C-1305 is associated with permanent G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*. 64(13):4487-97.
- Wieler S, Gagne JP, Vaziri H, Poirier GG, Benchimol S. 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation. *J Biol Chem*. 278(21):18914-21.
- Yoon YM, Baek KH, Jeong SJ, Shin HJ, Ha GH, Jeon AH, Hwang SG, Chun JS, Lee CW. 2004. WD repeat-containing mitotic checkpoint proteins act as transcriptional repressors during interphase. *FEBS Lett*. 575(1-3):23-9.
- Zeng C, Spielman AI, Vowels BR, Leyden JJ, Biemann K, Preti G. 1996. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(13):6626-30.
- Zhang SX, Bentel JM, Ricciardelli C, Horsfall DJ, Haagensen DE, Marshall VR, Tilley WD. 1998. Immunolocalization of apolipoprotein D, androgen receptor and prostate specific antigen in early stage prostate cancers. *J Urol*. 159(2):548-54.